

VALORIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS DE CENOURA. PROMOÇÃO DA COMPONENTE BIOACTIVA

Anastasiya Kuzina

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Margarida Gomes Moldão Martins

Coorientadora: Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu

Júri:

Presidente: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutor Vitor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Agradecimentos

Depois da realização deste trabalho para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Alimentar, quero agradecer a todas as pessoas que fizeram parte deste meu percurso académico, não só nesta fase final, mas ao longo dos 5 anos de aprendizagens, lutas, desafios, alegrias, tristezas e conquistas.

Quero deixar um agradecimento especial a todos os professores do Instituto Superior de Agronomia, sem eles nunca teria aprendido coisas que sei hoje em dia e que me permitiram chegar a este patamar.

Um obrigada muito especial a minha orientadora, Professora Doutora Margarida Moldão, que ao longo destes anos sempre foi prestável em tudo e nesta última fase da minha formação foi muito mais que uma professora, foi a minha amiga, conselheira, a mãe deste meu trabalho final. Obrigado muito sincero por todo o entusiasmo, força, apoio, boa disposição e disponibilidade que me dedicou ao longo dos últimos meses.

Por outro lado, agradeço a outras pessoas que estiveram envolvidas directamente no desenvolvimento deste trabalho. Um especial agradecimento a minha coorientadora, Doutora Marta Abreu, pelo apoio, profissionalismo, sentido crítico e paciência que demonstrou para comigo. Um obrigado muito grande também à Engenheira Carla Alegria por tudo o que me ensinou e pela sua receptibilidade sempre ao dispor.

Agradeço igualmente a Doutora Cristina Aleixo e à Engenheira Paula Silva pela disponibilidade demonstrada na realização de determinados ensaios.

Por fim, um obrigado enorme a pessoas amigas que me ajudaram quando mais precisei, principalmente Joana Rufino, Duarte Coelho e Diana Penim.

Resumo

O elevado volume de subprodutos gerados pela indústria de cenoura minimamente processada justifica o interesse na valorização dos mesmos. O objectivo do presente trabalho consistiu no estudo da utilização de stress abiótico (corte) na promoção da componente bioactiva de subprodutos de cenoura e posterior recuperação (extracção aquosa) e valorização (incorporação em pão).

Procedeu-se à caracterização da componente bioactiva, compostos fenólicos (CFT) e carotenóides (CCT), nos subprodutos de cenoura (SPC). O teor de compostos fenólicos é de 46,4 mg EAC.100 g⁻¹ de subproduto, sendo o ácido clorogénico o principal composto (2,88 mg.100 g⁻¹) detectado. O teor de compostos carotenóides é de 11,8 mg eq β-caroteno.100 g⁻¹ de subproduto, sendo o β-caroteno o composto maioritário (7,86 mg.100 g⁻¹).

A indução fenólica implicou síntese de compostos fenólicos atingindo valores de 87,2 mg EAC.100 g⁻¹ após 72 horas à temperatura de 5 °C. A optimização das condições de extracção aquosa assistida por ultra-sons ou à temperatura de ebulição permitiu concluir que as condições que implicam melhor recuperação de fenólicos são: tempos de extracção de 50 minutos numa razão de 4:1 (H₂O:SPC) em conjugação com ultra-sons.

A incorporação do extracto (20,5 mg/500 g farinha) e do subproduto de cenoura (20 g/500 g farinha) liofilizados em pão pode constituir uma forma de enriquecimento funcional deste sem alterar a qualidade sensorial.

Palavra-chave: subprodutos de cenoura; indução fenólica; compostos fenólicos; actividade antioxidante; ultra-sons; liofilização.

Abstract

The high volume of carrot byproducts from the fresh-cut industry (SPC) justifies the interest in its valorisation. The goal of the present investigation was to study the usability of abiotic stress (wound) in promotion of bioactive component of carrot byproducts and posterior recovery (water extraction) and valorisation (incorporation in bread).

Carrot byproducts demonstrated a valuable source of antioxidant compounds with a total phenolic compound (CFT) of 46.4 mg EAC.100 g⁻¹ and carotenoids (CCT) of 11.8 mg eq β-carotene.100 g⁻¹. Chlorogenic acid (2.88 mg.100 g⁻¹) and β-carotene (7.86 mg.100 g⁻¹) are the main components.

Abiotic stress treatment induced a significant phenolic accumulation reaching the values of 87.2 mg EAC.100 g⁻¹ after 72 hours in the temperature of 5 °C. The optimization of water extraction conditions assisted by ultra-sounds or at the boiling temperature allowed to conclude that the best conditions to recover phenolic compounds are: 50 minutes as time of extraction and ratio of 4:1 (water:sample) assisted by ultra-sounds.

The incorporation of extract (20.5 mg/500 g flour) or SPC (20 g/500 g flour) lyophilized in bread may constitute a form of functional enrichment without affecting the sensorial quality.

Keywords: carrot byproducts; phenolic induced; phenolic compounds; antioxidant activity; ultra-sounds; lyophilization.

Extended Abstract

The high volume of carrot byproducts from the fresh-cut industry (SPC) justifies the interest in its valorisation. These byproducts are a result of a discerning pick of raw material, which leads to the elimination of high quantities of raw nonconforming product, besides not eatable parts to achieve a final presentation of a product 100 % eatable.

It's general knowledge that carrots are the main source of α - and β -carotene, precursors of vitamin A, providing 17 % of the total of this vitamin that is needed for our organism. It's also known that besides the carotenoids, phenolic compounds are equally present in the carrot and that these have antioxidant activity.

In the post-harvest the vegetable tissues are still alive and have the capacity of synthesise secondary metabolites with technological and functional interest. This capacity may be increased by application of abiotic stress like wounding, phytohormones, UV radiation, thermal shock, hydric stress, hyperoxia, among others.

The goal of this task was studying the usability of abiotic stress (wound) in promotion of bioactive component of carrot byproducts and posterior recovery (water extraction) and valorisation (incorporation in bread).

In a first stage of this study, carrot byproducts demonstrated a valuable source of antioxidant compounds with a total phenolic compound (CFT) of 46.4 mg EAC.100 g⁻¹ and carotenoids (CCT) of 11.8 mg eq β -carotene.100 g⁻¹. Chlorogenic acid (2.88 mg.100 g⁻¹) and β -carotene (7.86 mg.100 g⁻¹) are the main components. These values indicate that the carrot byproducts have a good potential of an increase of value.

A priori of extraction of phenolic compounds, the material was submitted to an abiotic stress – wound, to induce the increase of these compounds. This treatment induced a significant phenolic accumulation reaching the values of 87.2 mg EAC.100 g⁻¹ after 72 hours in the temperature of 5 °C.

Before proceeding to the extraction, it was optimized by applying a previous treatment to the raw material. The material was submitted to a treatment with ultra-sounds and to a heat treatment at a temperature of 100 °C. Following these procedures, the favourable conditions of water extraction (assisted by ultra-sounds or by the boiling temperature) led to the conclusion that the best conditions to recover phenolic compounds are: 50 minutes of extraction and ratio of 4:1 (water:sample), assisted by ultra-sounds, reaching the values of 4.6 mg EAG.g⁻¹ of CFT. The application of ultra-sounds proved to be

the most effective due to the fact that the high intensity waves promoted the occurrence of damages in the cell wall and cell membranes, allowing a better penetration of solvent (water), benefiting the extraction of phenolic compounds (Novac *et al.*, 2008).

Subsequently, liquid extract (resulting from the previous step) and carrot byproducts were submitted to lyophilization, to obtain concentrated material in interest compounds, without water. At the end of this process, the outputs were of 2 % (m/m) in the case of the extract and 12 % (m/m) in the case of carrot byproducts. These samples were evaluated in terms of their antioxidant activity and in terms of their phenolic compounds. The phenolic extract was the one that presented higher values: 4,2 $\mu\text{M Trolox} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ and 1.0 $\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$ in detriment of 1,91 $\mu\text{M Trolox} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ and 0.019 $\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$ contained in carrot byproducts.

In the next step of this study, the incorporation of extract (20.5 mg/500 g flour) and of SPC (20 g/500 g flour) was performed to a food matrix – bread and the impact of this addition on bioactive and sensorial component was studied. In terms of antioxidant activity and of grades of phenolic compounds detected in these products, the result was very affected by the almost complete degradation of bioactive compound due to the heat treatment applied during the baking of the bread. In the extract, the obtained values are 0.11 $\mu\text{M Trolox} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ and 0.003 $\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$ while in the carrot residues the result was of 0.41 $\mu\text{M Trolox} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ and 0.018 $\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$. The slightly higher values observed in the carrot residues are due to a slight protection naturally given by the matrix present in carrot byproducts, while this matrix is lacking in the extract. Therefore, in order to promote the protection of this compounds, neither the extract, nor the carrot residues should be used without a previous encapsulation.

The incorporation of extract (20.5 mg/500 g flour) or SPC (20 g/500 g flour) lyophilized in bread may constitute a form of functional enrichment without affecting the sensorial quality.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Extended Abstract.....	IV
Índice	VI
Índice de Tabelas.....	IX
Índice de Figuras	X
Lista de abreviaturas.....	XII
Enquadramento do Tema e Objectivos	1
I. Revisão da Literatura	3
1. Valorização de subprodutos	3
1.1 O porquê da valorização de subprodutos das indústrias de Hortofrutícolas	3
1.2 Formas de valorização de subprodutos.....	8
2. Subprodutos da indústria de cenoura minimamente processada	12
2.1 Caracterização da composição bioactiva de subprodutos de cenoura	12
2.2 Importância para a saúde	16
3 Indução fenólica nos tecidos vegetais	19
II. Desenvolvimento Experimental	23
4. Materiais e Métodos Analíticos.....	23
4.1 Material Vegetal	23
4.2 Métodos analíticos.....	24
4.2.1 Preparação das amostras.....	24
4.2.2 Cor CIELab.....	24
4.2.3 pH	26
4.2.4 Teor de Sólidos Solúveis (TSS)	26
4.2.5 Microrganismos Totais a 30 °C.....	26
4.2.6 Conteúdo Fenólico Total	26
4.2.7 Determinação do perfil fenólico e quantificação do ácido clorogénico.....	28
4.2.8 Determinação do conteúdo em carotenóides totais	29
4.2.9 Quantificação do teor em β -caroteno.....	29
4.2.10 Actividade Antioxidante	30
4.2.11 Determinação dos teores de água e matéria seca	32

5.	Caracterização Qualitativa da Composição Bioactiva de Subprodutos de Cenoura	33
5.1	Delineamento experimental	33
5.2	Resultados e Discussão	33
5.2.1	pH e TSS	33
5.2.2	Composição Bioactiva (teores totais de fenólicos e de carotenóides)	33
5.3	Balanço intercalar	36
6.	Avaliação da Indução Fenólica ao Corte nos Subprodutos de Cenoura	37
6.1	Delineamento experimental	37
6.2	Tratamento e Discussão dos Resultados	38
6.2.1	CorCIELab	38
6.2.2	pH e Teor sólidos totais	39
6.2.3	Teor fenólico total	41
6.2.4	Contagens microbiológicas	43
6.3	Balanço intercalar	44
7.	Optimização das Condições de Extracção de Compostos Fenólicos a Partir de Subprodutos de Cenoura	45
7.1	Delineamento experimental	45
7.2	Procedimento experimental	47
7.3	Tratamentos dos resultados	48
7.4	Resultados e discussão	48
7.5	Balanço intercalar	52
8.	Obtenção de Extracto Fenólico e Subprodutos de Cenoura Desidratados	53
8.1	Procedimento	53
8.2	Caracterização dos extractos fenólicos e do subproduto liofilizados	53
8.3	Resultados e Discussão	54
8.3.1	Rendimento	54
8.3.2	Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos	54
8.4	Balanço intercalar	55
9.	Incorporação dos Resíduos de Cenoura e do Respectivo Extracto Aquoso Liofilizado em Pão	56
9.1	Procedimento	56
9.2	Determinações analíticas	57
9.2.1	Actividade antioxidante e teor de compostos fenólicos	57
9.2.2	Análise sensorial	57
9.3	Resultados e Discussão	58
9.3.1	Actividade antioxidante e teor de compostos fenólicos	58
9.3.2	Análise sensorial	60
9.4	Balanço Intercalar	60

10.	Conclusões Gerais e Linhas de Investigação Futura.....	61
10.1	Conclusões Gerais.....	61
10.2	Linhas de Investigação Futura.....	62
11.	Referências bibliográficas.....	63
Anexos.....		72

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Segmento de Preparação e Conservação de Produtos Hortícolas Processados entre 2010 e 2011.	4
Tabela 2 - Classificação do nível de escurecimento (WI) da amostra.	26
Tabela 3 - Teores totais médios de compostos fenólicos (CFT), carotenóides (CCT) (\pm DP), ácido clorogénico e β -caroteno (\pm DP) de subprodutos de cenoura.	34
Tabela 4 - Condições experimentais do ensaio.	38
Tabela 5 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0, 1 e 3 dias) nos valores médios (\pm DP) dos parâmetros CIELab ($^{\circ}$ L e WI) da cor de amostras de subprodutos de cenoura.	39
Tabela 6 - Matriz codificada e decodificada para optimização das condições de extracção.	46
Tabela 7 - Coeficientes de regressão e respectivas probabilidades do modelo quadrático para compostos fenólicos.	49
Tabela 8 - Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos nas amostras em estudo.	54
Tabela 9 - Valores da capacidade antioxidante e do teor de compostos fenólicos nas 3 amostras em estudo.	59
Tabela 10 - Diferença nas somas das ordens observadas entre as 3 amostras (A – pão simples; B – pão com subprodutos; C – pão com extracto).	60
Tabela 11 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0, 1 e 3 dias) nos valores médios de pH e TSS (\pm DP) de amostras de subprodutos de cenoura.	73
Tabela 12 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0, 1 e 3 dias) nos valores médios de teor fenólico total (\pm DP) de amostras de subprodutos de cenoura.	74
Tabela 13 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0 e 3 dias) nas contagens médias de Microrganismos a 30 °C (\pm DP) de amostras de subprodutos de cenoura.	74

Índice de Figuras

Figura 1 – Roda dos Alimentos e Balança Alimentar Portuguesa 2008 – 2012 (Fonte: Instituto Nacional de Estatística).	3
Figura 2 - Pirâmide de hierarquia de valorização de resíduos (Fonte: Adaptado da VALUE, 2012).	7
Figura 3 - Estrutura básica dos flavonóides.....	14
Figura 4 - Classificação das principais classes de flavonóides na natureza.....	15
Figura 5 - Estruturas moleculares de alguns carotenóides encontrados nos vegetais.....	16
Figura 6 - Comparação entre engenharia genética e stress abiótico pós-colheita na estratégia de sobreexpressão de metabolitos secundários (Fonte: Jacobo-Velázquez, 2012). ...	21
Figura 7 - Diagrama geral do processamento mínimo de hortofrutícolas com indicação dos locais/operações (a laranja) onde é descartado o material vegetal que vai constituir os subprodutos.	23
Figura 8 - Matéria-prima: subprodutos de cenoura minimamente processada.....	24
Figura 9 - Curva de calibração do ácido clorogénico para determinação de compostos fenólicos.	27
Figura 10 - Curva de calibração do ácido gálico para determinação de compostos fenólicos.	27
Figura 11 – Curva de calibração de ácido gálico para determinação directa de compostos fenólicos.	28
Figura 12 - Curva de calibração do método DPPH.	31
Figura 13 - Curva de calibração do método FRAP.	32
Figura 14 - Perfil fenólico característico dos subprodutos de cenoura obtido por HPLC-DAD. Cromatograma extraído a 340 nm, com identificação do ácido clorogénico ($tr_{padrão} = 8,897$ min; $\lambda_{max} = 243,3; 326,1$ nm) e respectivo espectro comparado com padrão puro.	35
Figura 15 - Identificação do β -caroteno em subprodutos de cenoura obtido por HPLC-DAD. Cromatograma extraído a 450 nm, com identificação do pico de β -caroteno ($tr_{padrão} = 1,267$ min; $\lambda_{max} = 450$ nm) e respectivo espectro.	36
Figura 16 - Subprodutos de cenoura minimamente processada triturados.	38
Figura 17 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0, 1 e 3 dias) nos valores médios de pH de amostras de subprodutos de cenoura. As barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%.	40
Figura 18 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0, 1 e 3 dias) nos valores médios de	

TSS de amostras de subprodutos de cenoura. As barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%. 41

Figura 19 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0, 1 e 3 dias) nos valores médios de teor fenólico total (\pm DP) de amostras de subprodutos de cenoura. As barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%...... 42

Figura 20 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0 e 3 dias) nas contagens médias de Microrganismos a 30 °C de amostras de subprodutos de cenoura. As barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%...... 43

Figura 21 - Diagrama do processo de execução..... 47

Figura 22 - Superfície de resposta para o teor de CFT (projecção no ponto central) em função da relação solvente:soluto e do tempo de extracção assistida por ultra-sons..... 50

Figura 23 - Superfície de resposta para o teor de CFT (projecção no ponto central) em função da relação solvente:soluto e do tempo de extracção com aplicação do tratamento térmico a 100 °C..... 51

Figura 24 – Extracto aquoso e subproduto de cenoura liofilizados. 54

Figura 25 - Pão salio após cozedura: 1 - com extracto; 2 – simples; 3 – com subproduto. 56

Figura 26 - Amostras para análise sensorial: 1 – miolo de pão simples; 2 – miolo de pão com subproduto; 3 – miolo de pão com extracto..... 57

Figura 27 - Amostras de pão: 1 – simples; 2 - com subproduto de cenoura; 3 - com extracto. 58

Lista de abreviaturas

AAO – actividade antioxidante

CC – com corte

CCT – compostos carotenóides totais

CFT – compostos fenólicos totais

AC – ácido clorogénico

DA – digestão anaeróbia

DP – desvio padrão

EAC – equivalentes de ácido clorogénico

EAG – equivalentes de ácido gálico

HF – hortofrutícolas

HFMP – hortofrutícolas minimamente processados

INE – Instituto Nacional de Estatística

PAL – *phenylalanine ammonia lyase* (feninalanina-amonia-liase)

POD – *peroxidase*

PPO – *polyphenoloxidase* (polifenoloxidase)

SC – sem corte

SPC – subprodutos de cenoura

TA – temperatura ambiente

TSS – teor de sólidos solúveis

Enquadramento do Tema e Objectivos

Nas unidades industriais de produção de produtos hortofrutícolas minimamente processados, é gerado um grande volume de resíduos. O destino destes subprodutos dirige-se normalmente para a alimentação animal ou são lançados no meio ambiente, causando impactes ambientais negativos.

Nos últimos anos têm sido estudadas e adoptadas várias alternativas para a transformação destes produtos, acrescentando-lhes valor para além de redução dos custos associados ao respectivo tratamento, armazenamento e transporte. A implementação de metodologias de valorização de subprodutos a par do processo produtivo principal contribui para a diversificação da oferta dos produtos e a redução da emissão de resíduos sólidos.

Por outro lado, o sector agro-industrial e a comunidade científica estão entusiasmados com o potencial dos alimentos funcionais para conseguir melhorar a saúde e bem-estar dos cidadãos, promovendo a diversificação nas suas dietas e tornando viáveis produtos de alto valor agregado, criando novos nichos de mercado. Por esta razão, na sociedade actual, têm surgido processos emergentes para aproveitamento sustentável dos resíduos de produtos hortofrutícolas, fontes naturais de compostos bioactivos (Moretti, 2006).

A valorização de subprodutos na óptica da recuperação de fitoquímicos bioactivos assenta na composição da matéria vegetal eliminada, nomeadamente por possuir quantidades elevadas de substâncias antioxidantes naturais e/ou outros de interesse biológico e/ou sensorial, tais como compostos fenólicos, pigmentos, fibras, vitaminas e sais minerais. Em consequência os subprodutos vegetais podem constituir matrizes promissoras e baratas para a extracção de fitoquímicos de utilização diversificada quer na própria indústria alimentar quer noutro tipo de indústrias, como a farmacêutica e a cosmética.

Com este trabalho pretende-se contribuir para a valorização de subprodutos de cenoura provenientes de uma indústria de hortofrutícolas minimamente processados, através do desenvolvimento de processos sustentáveis de recuperação das substâncias bioactivas presentes nestas matrizes. Para o efeito foram realizados os seguintes estudos:

- Caracterização qualitativa dos subprodutos com vista à identificação da composição bioactiva principal, designadamente compostos fenólicos e carotenóides (**Capítulo 5**).

- Avaliação de processos prévios à extracção com vista ao incremento da composição bioactiva inicial através da indução fenólica pelo corte (**Capítulo 6**).
- Optimização das condições de extracção da componente bioactiva (**Capítulo 7**).
- Incorporação do extracto obtido e do subproduto liofilizado numa matriz alimentar (**Capítulo 9**).

I. Revisão da Literatura

1. Valorização de subprodutos

1.1 O porquê da valorização de subprodutos das indústrias de Hortofrutícolas

Segundo estudos realizados pelo Instituto Nacional de Estatística (INE) entre 2008 e 2012, o único grupo de produtos alimentares cuja disponibilidade diária *per capita* aumentou foi o dos “produtos hortícolas” (+5,8 %), mas ainda assim não é o suficiente para corrigir o desequilíbrio deste grupo face ao recomendado pela Roda dos Alimentos (Figura 1).

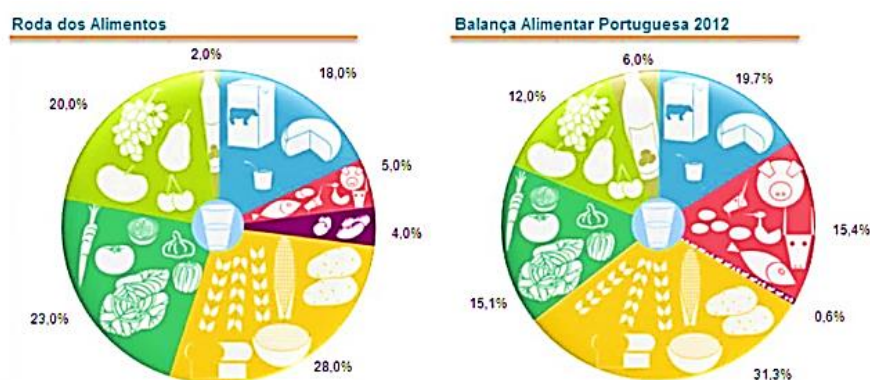


Figura 1 – Roda dos Alimentos e Balança Alimentar Portuguesa 2008 – 2012 (Fonte: Instituto Nacional de Estatística).

Com o aumento progressivo do consumo dos produtos hortofrutícolas e para acompanhar as exigências dos consumidores, surge o conceito de hortofrutícolas minimamente processados (HFMP), também designados como produtos frescos cortados ou produtos de IV Gama. Segundo a *International Fresh-cut Produce Association* - IFPA (2005), os produtos denominados *fresh-cut* são definidos como frutas e hortícolas, ou combinação destes, que tenham sido fisicamente alteradas em relação a sua forma original, isto é, descascadas, cortadas em formato pronto para o consumo e embaladas, sendo oferecido ao consumidor um produto nutritivo e conveniente.

Os motivos que levam os consumidores a adquirirem estes produtos são a conveniência, o valor nutritivo e a segurança do alimento, além do menor subproduto doméstico, pois permitem ao consumidor a obtenção apenas de porções necessárias e a oportunidade de avaliar imediatamente a qualidade do produto a ser adquirido (Moretti, 2007).

A procura por estes atributos levou à considerável inovação e diversificação das indústrias de minimamente processados, que têm vindo a crescer com o avançar dos anos. No entanto, o mercado de minimamente processados continuará em crescimento se os consumidores acreditarem na segurança e na qualidade destes alimentos. Por isso, tem de haver cuidados especiais no que diz respeito a preservação da qualidade na cadeia de comercialização, a manutenção da cadeia do frio e logística adequada, adequação de equipamentos e disponibilidade de tecnologias para implementação das indústrias de processamento, e programas de certificação que garantam a qualidade e a segurança dos produtos (Rolle, 2010).

Em Portugal, o segmento de Preparação e Conservação de Frutos e Produtos Hortícolas Processados, onde se inserem as indústrias de HFMP, constitui um dos segmentos do sector alimentar com um bom crescimento (INE, 2012). Segundo a mesma fonte, apesar de haver uma diminuição na quantidade produzida nos anos compreendidos entre 2010 e 2011, 341 872 e 339 240 toneladas respectivamente, a quantidade vendida e o valor das vendas foram ligeiramente superiores (Tabela 1).

Tabela 1 - Segmento de Preparação e Conservação de Produtos Hortícolas Processados entre 2010 e 2011.

	2010	2011	Δ (%)
Quantidade Produzida (t)	341 872	339 240	- 0,8
Quantidade Vendida (t)	261 529	307 600	15,0
Valor das vendas (10³€)	246 088	285 914	13,9

Fonte: Estatísticas Agrícolas 2012

A obtenção dos produtos HFMP envolve operações de escolha, calibração, lavagem, processamento propriamente dito (eliminação das partes não edíveis e redução de dimensões), descontaminação, enxaguamento, escorrimento/secagem, pesagem e embalagem.

As etapas de escolha e calibração consistem na eliminação do material estranho ou de qualidade deficiente e a uniformização das dimensões. Estas operações podem ser realizadas manualmente ou com o auxílio de um equipamento de calibração, tendo em especial atenção a minimização de danos mecânicos.

Segue-se a operação de lavagem que consiste em lavar e reduzir contaminações (microbianas e de resíduos químicos) nos produtos. Esta deve ser realizada recorrendo a água potável e refrigerada ($< 5^{\circ}\text{C}$).

Com a eliminação das partes não edíveis pretende-se obter produtos inteiramente comestíveis. Esta eliminação pode ser feita manualmente, com auxílio de facas ou através de abrasão, tendo sempre o cuidado de minimizar os danos mecânicos.

Através da redução de dimensões (corte) obtém-se produtos de medidas adequadas ao tipo de apresentação pretendida. Este corte pode ser manual ou mecânico.

Na operação de descontaminação usualmente, realizada em tanques com água clorada, verifica-se uma redução da carga microbiana. É necessário ter em atenção a qualidade e a temperatura da água, assim como, a concentração do agente de descontaminação.

O enxaguamento tem por objectivo a redução da concentração do agente de descontaminação para limites legais, de modo a não comprometer a segurança e a qualidade sensorial dos produtos. É necessário ter cuidado para evitar possível recontaminação.

O escorrimento ou secagem pretende eliminar o excesso de água, minimizando assim possível desenvolvimento microbiano. É realizado com auxílio de centrífugas ou através de túnel de secagem, tendo um cuidado especial em minimizar ocorrência de possíveis danos físicos e recontaminação.

Por fim, na pesagem e na embalagem é necessário ter em atenção vários factores, entre os quais: evitar recontaminação, garantir a estanquicidade da embalagem e controlar a massa do produto e a composição da atmosfera, caso se opte por atmosfera modificada activa.

Este processamento torna as frutas e as hortícolas mais perecíveis em relação às respectivas matérias-primas, pois estas passam a ter respostas fisiológicas acrescidas, isto é, aumento da respiração e produção de etileno, bem como escurecimento enzimático, perda de humidade, entre outros. Além disso, a remoção de tecidos protectores e a libertação dos nutrientes em função do corte favorecem o desenvolvimento microbiano nestes produtos (Watada *et al.*, 1990; Chitarra, 1998). Por estas razões neste tipo de processamento é necessário efectuar uma escolha criteriosa da matéria-prima, conduzindo

à eliminação de quantidades elevadas de matéria-prima não conforme, para além das partes não edíveis, para conseguir a apresentação final de um produto 100 % comestível.

A indústria agro-alimentar de processamento de HF gera grande quantidade de subprodutos com elevados teores de matéria orgânica para os quais não existe, frequentemente, colocação, de onde resulta a acumulação deste material em áreas anexas à unidade fabril e consequentemente elevado risco de poluição ambiental (Gonçalves, 2005).

No estudo realizado por Ayala-Zavala *et al.* (2010) foram caracterizados volumes de subprodutos gerados na produção de diferentes hortofrutícolas minimamente processados tendo-se concluído que em alguns casos a quantidade de subproduto gerada excede a quantidade de produto final obtida. Estes materiais caracterizam-se por serem muito perecíveis tendo em conta o elevado teor de matéria orgânica presente em associação ao elevado teor de humidade (70 – 90 %) e à elevada contaminação microbiológica. No caso específico da cenoura, os subprodutos podem variar entre 30 a 40 % (Schieber *et al.*, 2001).

Face ao exposto, as empresas de HFMP devem encarar os subprodutos, não apenas como algo a reduzir e retirar da unidade industrial, mas como matérias-primas de valorização. Em primeiro plano é necessário ter uma atitude preventiva de modo a procurar reduzir os valores destes produtos. Para conseguir isso, os esforços devem centrar-se no desenvolvimento da eficiência dos processos e nos planos de prevenção de geração de resíduos, através de aplicação de tecnologias de minimização, promovendo a sua reutilização tanto interna como externa, assim como a reciclagem (Value, 2012).

No aproveitamento de resíduos (Figura 2), depois de tentar a sua redução ao mínimo, deve-se promover em primeiro lugar o uso alimentar (humano e animal). Seguidamente a prioridade é dada a outros aproveitamentos industriais, como valorização energética, ou a valorização para uso em agronomia (compostagem). Só em último caso é que se deve optar pelo aterro sanitário ou a incineração.

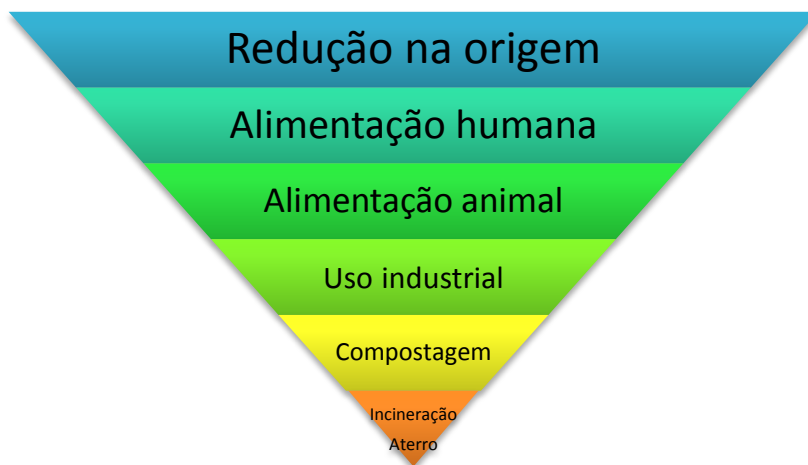


Figura 2 - Pirâmide de hierarquia de valorização de resíduos (**Fonte:** Adaptado da VALUE, 2012).

Para uma correcta selecção da tecnologia de valorização de subprodutos é necessário considerar alguns aspectos muito importantes, entre os quais, o conhecimento do sector que gera os subprodutos em termos de tipo de actividade praticada, dos processos utilizados, da sazonalidade e da tipologia de matéria-prima processada.

Por outro lado, é necessário analisar três pontos-chave: tipo de subproduto, a aplicação e o grau de viabilidade. No tipo de subproduto é importante entender a sua origem, ou seja, o processamento ao qual este foi submetido, a sua qualidade, sazonalidade da produção e a homogeneidade. Em termos de aplicação, é importante caracterizar os subprodutos para conhecer o seu potencial de aproveitamento e consoante isso, seleccionar o melhor processo de valorização. É tão importante conhecer o potencial de valorização do subproduto, como a existência ou não de um mercado alvo para o produto obtido. No que respeita a análise do grau de viabilidade, esta pode ser apenas experimental, ou seja, verificando-se o desenvolvimento ao nível de ensaios laboratoriais e protótipos piloto, ou pode ser de um grau médio ou alto, desenvolvimento semi-industrial ou ao nível industrial, respectivamente (Value, 2012).

Conhecidas as características dos subprodutos vegetais que passam a ser matéria-prima dos processos de valorização, é importante que o processo escolhido seja o mais universal possível, uma vez que é necessário ter em consideração a legislação em vigor, factores técnicos, económicos e de mercado.

1.2 Formas de valorização de subprodutos

Valorização Alimentar

Os subprodutos das indústrias de HF podem ser valorizados com fins alimentares, quer por incorporação em alimentos, quer para obtenção de extractos para posterior utilização.

A utilização directa implica normalmente preparação prévia, como por exemplo a secagem, a fim de permitir melhor capacidade de conservação dos compostos a valorizar. Subprodutos líquidos podem ser submetidos a processos de liofilização, normalmente depois de uma separação prévia por tecnologia de membranas.

Os processos de filtração por membranas destacam-se como alternativas aos processos convencionais de separação. Em muitos casos, o baixo consumo de energia, a redução no número de etapas do processamento, maior eficiência na separação e melhor qualidade do produto final obtido são os seus principais atractivos (Strathmann, 1990).

O factor que distingue os processos comuns em relação aos de separação por membranas (microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa) é a aplicação de pressão hidráulica para acelerar o processo de transporte. A natureza da membrana controla os componentes que são permeados e os que são retidos, uma vez que os mesmos são diferencialmente separados de acordo com a massa molecular ou tamanho e estrutura de partícula (Cheryan, 1998).

Os líquidos também podem ser secos por atomização. A secagem por atomização (*spray-drying*) envolve a pulverização de um líquido, formando gotículas que são lançadas numa câmara fechada. As gotículas entram em contacto com uma corrente de ar aquecido, que fornece o calor necessário à evaporação, havendo, assim, formação de partículas secas (Azeredo, 2004). A vantagem deste processo é o baixo tempo de permanência do produto no secador, de 5 a 100 segundos, o que é um factor positivo para produtos termosensíveis, como é o caso de muitos dos constituintes a valorizar nos subprodutos.

No caso de subprodutos sólidos ou líquidos concentrados a secagem pode efectuar-se por vaporização de água (convencional) ou por sublimação (liofilização).

Para além do referido a secagem por microondas permite acelerar consideravelmente o processo. O dano térmico que este tipo de aquecimento produz é baixo e não provoca alterações na cor (Andreola, 2013).

A incorporação dos subprodutos desidratados em produtos alimentares pode ser efectuada de diferentes formas, consoante o produto a desenvolver. Uma das formas possíveis é a extrusão-cozedura. O processo de extrusão-cozedura é um processo que associa elevadas temperaturas e pressões a tempos curtos de processamento permitindo obter novas texturas.

Os subprodutos de hortofrutícolas podem ainda ser valorizados através de extracção sólido-líquido de compostos bioactivos, sobretudo antioxidantes, com interesse para a indústria alimentar, farmacêutica ou outras. No caso de produtos mais termosensíveis e de elevado valor acrescentado a extracção pode ser efectuada por fluidos supercríticos.

A obtenção de compostos antioxidantes mediante extracção com fluidos supercríticos, como o dióxido de carbono constitui um método moderno e eficiente (Pokorny *et al.*, 2001). Devido à sua baixa viscosidade e alta capacidade de difusão, os fluidos supercríticos apresentam propriedades de transporte melhores que os líquidos. Podem difundir-se facilmente através de materiais sólidos, promovendo melhor resultado em termos de rendimento da extracção (Del Valle e Aguillera, 1999; Raventós *et al.*, 2002). A extracção supercrítica produz extractos isentos de resíduos de solvente e pode ser realizada a baixas temperaturas, preservando a qualidade de compostos termosensíveis (Zancan *et al.*, 2002).

Outras vantagens como, por exemplo, a alta pureza dos extractos e a grande eficiência do processo podem torná-la viável para aplicação em alimentos (Herrero *et al.*, 2006). As indústrias alimentares, cosméticas e farmacêuticas, têm vindo a demonstrar um interesse crescente pela extracção supercrítica em vez dos processos de extracção convencionais. O grande inconveniente da extracção supercrítica reside na alta pressão necessária para a operação o que requer equipamentos excessivamente caros, elevando o custo do produto final.

Para a identificação e isolamento de compostos bioactivos a partir de fontes naturais é por vezes necessária a realização de extracção com solventes de polaridades diferentes. É ainda necessário ter presente a necessidade de preservar compostos sensíveis à luz, oxigénio e calor, como muitos dos compostos antioxidantes (Vekiari *et al.*, 1993; Azizah *et al.*, 1999). Para melhorar a eficiência de extracção a matéria-prima é por norma previamente desidratada e moída.

Na extracção sólido-líquido os solventes mais utilizados são a água (acidificada ou não) e etanol. Este tipo de extracção pode ser assistido por microondas ou ultra-sons (sonicação) (Value, 2012).

A extracção assistida por microondas proporciona técnicas selectivas e rápidas, mediante as quais se consegue obter recuperações melhores ou semelhantes às obtidas pelos processos de extracção convencionais. Por outro lado, com este tipo de extracção há menor consumo energético, menor volume de solventes utilizados, assim como menor quantidade de resíduos gerados. A extracção ocorre pelo aquecimento interno e externo da matriz sólida, através dos impulsos provenientes dos microondas. Deste modo, forma-se um gradiente térmico, que permite a extracção de compostos de interesse de maneira mais eficiente e selectiva.

A sonicação, ou seja, extracção assistida por ultra-sons, consiste na geração de cavitações através de ondas sonoras num meio líquido, gerando forças de compressão e descompressão. Esta técnica permite reduzir os tempos de extracção ao produzir um aumento da pressão, que favorece a penetração e o transporte dos compostos, e um incremento de temperatura que aumenta a solubilidade e facilita a difusibilidade.

Valorização Energética

A valorização energética dos subprodutos de hortofrutícolas pode ser para a produção de bioetanol ou de biogás.

O bioetanol tem sido considerado uma alternativa para diminuir problemas ambientais e energéticos no mundo, uma vez que os combustíveis fósseis são um recurso escasso, de elevado custo e poluente. Comparado aos combustíveis fósseis, o etanol apresenta as vantagens de ser uma fonte renovável de energia, e de contribuir para a redução das emissões de dióxido de carbono (Pacheco, 2011).

O bioetanol é produzido pela fermentação dos açúcares existentes na fracção orgânica das plantas. Com este processo consegue-se obter álcool hidratado, que contém cerca de 5 % de água, que após a desidratação pode ser utilizado como combustível. O bioetanol misturado com a gasolina produz um biocombustível de elevado poder energético com características muito idênticas á de gasolina, mas com uma importante redução de emissões contaminantes nos motores de combustão tradicionais. O etanol é utilizado em misturas com a gasolina numa concentração de 5 ou de 10 %, o que não requer quaisquer modificações nos motores actuais.

Os subprodutos vegetais podem constituir uma boa fonte para obtenção de bioetanol. É importante destacar que o bioetanol é internacionalmente reconhecido por ser uma fonte de energia natural, limpa, renovável, sustentável e mais democrática do que os combustíveis fósseis (SRHE, 2014).

A digestão anaeróbia (DA) é um processo de degradação de matéria orgânica na ausência de oxigénio, que conduz a obtenção de uma mistura gasosa conhecida como biogás. Com um conteúdo energético semelhante ao do gás natural, é constituído principalmente pelo dióxido de carbono (CO_2) e gás metano (CH_4). Como os outros combustíveis, este também é inflamável quando colocado sob pressão. O biogás pode ser usado para a geração de energias eléctrica, térmica e mecânica (Roya *et al.*, 2011).

Valorização Agrícola

A nível agrícola os subprodutos de HF podem ser utilizados para compostagem ou como adsorventes.

O composto resultante da compostagem é utilizado na agricultura e jardinagem com função de enriquecer o solo, mas também pode ser utilizado em paisagismo, controlo da erosão, revestimento e recuperação de solos.

Existem certos grupos de subprodutos das agro-indústrias que possuem interessantes propriedades de adsorventes, que podem ser utilizados na descontaminação de efluentes contaminados com metais pesados. Entre estes materiais podem-se destacar cascas de noz e de arroz, dreche de cerveja e cascas de milho. Este tipo de valorização, apenas existe ao nível experimental sendo necessário proceder ao *scale-up* (Value, 2012).

2. Subprodutos da indústria de cenoura minimamente processada

2.1 Caracterização da composição bioactiva de subprodutos de cenoura

Diversos estudos científicos comprovam que alguns alimentos, para além de fornecerem uma componente energética e nutrientes essenciais, possuem compostos capazes de produzir efeitos positivos na saúde e bem-estar dos consumidores (Betoret *et al.*, 2011). Estes compostos podem ser encontrados nos alimentos, que são por isso, denominados como alimentos funcionais. Segundo Raghuvier e Tandon (2009) os alimentos funcionais são aqueles que, para além de cumprir as funções nutritivas básicas, oferecem ainda compostos dotados de bioactividade, benéficos para a saúde, que reduzem o risco de aparecimento de determinadas doenças.

Actualmente, os compostos funcionais com maior importância e os mais utilizados são os prebióticos, os antioxidantes, as vitaminas e alguns minerais. Tem sido atribuída prioridade à produção/extracção de prebióticos e compostos antioxidantes a partir de materiais vegetais, através de processos optimizados que permitem reduzir a perda destes componentes (Garjek *et al.*, 2005).

Segundo o USDA (*United States Department of Agriculture*) (2003), a cultura de cenoura, em termos de consumo *per capita*, ocupa o sexto lugar no *ranking* das 22 culturas vegetais mais populares. Este aumento justifica-se, principalmente, pela utilização deste produto nas indústrias de minimamente processados. Como consequência, a geração de subprodutos desta cultura também acresce, despertando uma maior preocupação em estudar possíveis métodos de valorização destes materiais.

É de conhecimento geral que a cenoura (*Daucus carota* L.) é a principal fonte de α - e β -caroteno, precursores de vitamina A, fornecendo 17 % do total desta vitamina necessária para o nosso organismo (Block, 1994). Sabe-se também que, para além dos carotenóides, os compostos fenólicos estão igualmente presentes na cenoura e que estes possuem actividade antioxidante.

Num estudo prévio efectuado numa empresa de minimamente processados foi caracterizado um volume de subprodutos gerados por mês, *ca* de 138 toneladas o que representou cerca de 30 % da totalidade das matérias-primas laboradas (Baeta, 2014). Neste estudo foram identificados quatro classes de subprodutos tendo por base a composição principal veiculada pelas diferentes matérias-primas e, volumes laborados, em contexto real da empresa: I – Batata (42,8 t/mês), II – Cenoura (15,2 t/mês), III – Frutos

(24,8 t/mês) e IV – Folhosas (55,2 t/mês). Segundo Baeta (2014) os subprodutos de cenoura apresentam teores de compostos fenólicos totais de $30,4 \pm 2,0$ mg EAC.100 g⁻¹ e $5,5 \pm 0,3$ mg β -caroteno.100 g⁻¹, correspondendo a uma capacidade antioxidante total de $70,7 \pm 5,5$ mg ET.100 g⁻¹. Nos vegetais as cascas concentram teores mais elevados de compostos bioactivos face às partes edíveis. Em cenoura estes teores foram avaliados nos diferentes tecidos: cascas, córtex e tecidos vasculares, apresentando teores de fenólicos totais de 260, 50 e 40 mg EAC.100 g⁻¹ respectivamente (Silva, 2013). Esta realidade caracteriza uma superioridade de 7 vezes nos tecidos casca *versus* os tecidos internos. No mesmo estudo e relativamente ao teor total de carotenóides verificou-se ausência de diferenças significativas em função da localização do tecido.

Segundo o Zhang e Hamauza (2004), os compostos fenólicos diminuem o seu teor da casca para o floema e do floema para o xilema, por outro lado, a actividade antioxidante apresenta a mesma distribuição na raiz que o conteúdo fenólico. Segundo o mesmo autor, as cenouras contêm principalmente ácido hidroxicinâmico e derivados. Entre estes, aquele que está presente em maior quantidade é o ácido clorogénico. Desta forma, uma alternativa viável para os subprodutos gerados a partir desta matéria-prima seria destiná-los à extracção de compostos bioactivos úteis à química de produtos naturais.

Os antioxidantes são um conjunto heterogéneo de substâncias formado por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que bloqueiam o efeito prejudicial dos radicais livres, promovendo a sua eliminação pela cedência de átomos de hidrogénio, captação de radicais e, algumas vezes, através da quelatação de metais. A geração de radicais livres, fisiológica ou não, é normalmente equilibrada pela acção de antioxidantes endógenos e exógenos (Ou *et al.*, 2002).

Os antioxidantes endógenos são produzidos pelo próprio organismo e podem ser classificados em enzimáticos e em não-enzimáticos, onde estes últimos são divididos em antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos (Pokorny *et al.*, 2001).

Os exógenos ou dietéticos, são adquiridos por meio da ingestão alimentar: vitamina C, vitamina E, carotenóides, compostos fenólicos e outros metabolitos secundários vegetais, para além de zinco, cobre, selénio e magnésio.

Os antioxidantes endógenos e exógenos em conjunto promovem reacções de regeneração que optimizam a protecção do organismo contra os radicais livres (Shahidi e Ho, 2007).

Em termos de classificação, os antioxidantes podem ser de origem sintética ou de origem natural. Normalmente os antioxidantes naturais são mais aceites por parte do consumidor e são definidos como substâncias que estão contidas e podem ser extraídas dos tecidos das plantas e dos animais e também, são formadas durante a confecção ou processamento de alimentos de origem vegetal ou animal. Podem encontrar-se em praticamente todas as plantas, microrganismos, fungos e tecidos animais. Na maioria são compostos fenólicos, entre os quais os grupos principais são os tocoferóis, os flavonóides e os ácidos fenólicos (Pokorny *et al.*, 2001).

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias com actividade biológica, amplamente distribuídas na natureza e já foram detectados mais de 8 000 compostos fenólicos em plantas. Este grande e complexo grupo, que contém um ou mais anéis aromáticos, faz parte dos constituintes de uma variedade de vegetais, frutas e produtos industrializados. Podem contribuir ou não para a cor dos alimentos, são produtos do metabolismo secundário, normalmente derivado de reacções de defesa das plantas contra agressões ambientais. Os compostos fenólicos podem classificar-se como flavonóides e não-flavonóides (Brand-Wiliams *et al.*, 1995).

O grupo de compostos fenólicos mais relevante nos alimentos é o dos flavonóides. A estrutura básica destes consiste num núcleo flavano, constituído por quinze átomos de carbono arranjados em três anéis ($C_6-C_3-C_6$) sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (Figura 3).

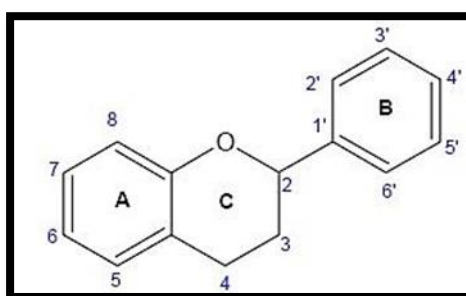


Figura 3 - Estrutura básica dos flavonóides.

A este grupo pertence um número alargado de classes (Figura 4) de compostos como os flavanóis, os flavonóis, as flavanonas, as flavonas, isoflavonóides e as antocianidinas. A explicação para a existência de uma grande diversidade estrutural de flavonóides justifica-se pelas modificações que estes compostos podem sofrer no seu

padrão de oxidação, entre os quais: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras (Aherne e O'brein, 2002; Moraes *et al.*, 2006).

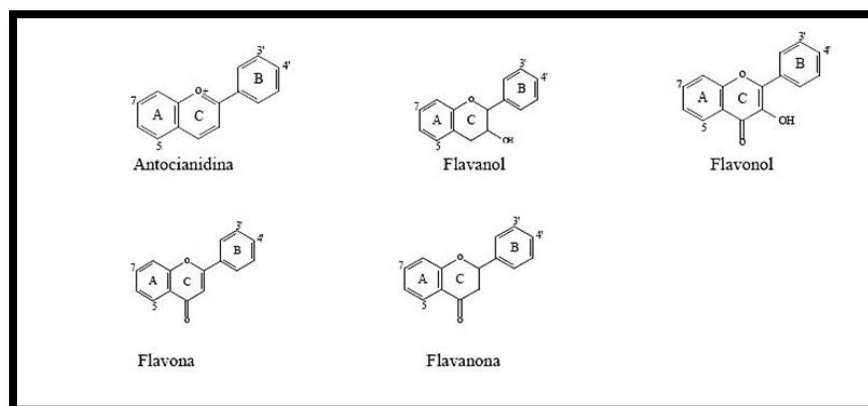


Figura 4 - Classificação das principais classes de flavonóides na natureza.

Os ácidos fenólicos, também designados de compostos não-flavonóides, caracterizam-se por ter um anel benzênico, um grupo carboxilo e um ou mais grupos hidroxilo e/ou metoxilo na sua molécula (Dimitrios, 2006).

Estes compostos dividem-se em três grupos. O primeiro é constituído pelos ácidos benzóicos e são os ácidos fenólicos mais simples que se encontram na natureza. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos. Por fim, as cumarinas são derivadas do ácido cinâmico (Soares, 2002).

Carotenóides

Os carotenóides constituem um grupo de pigmentos lipossolúveis que conferem cores, que vão do amarelo ao vermelho e estão presentes em muitas frutas e vegetais. Estes compostos podem ser divididos em dois grandes grupos: os carotenos, que são puramente hidrocarbonetos e não contêm oxigénio, e as xantofilas, que contêm oxigénio (Britton, 1992).

Em plantas superiores, os carotenóides estão localizados em organelos sub-celulares (cloroplastos e cromoplastos). Nos cloroplastos encontram-se associados principalmente á proteínas e são, normalmente, disfarçados pela presença de outros pigmentos clorofílicos dominantes. Actuam como estabilizadores de membranas e no processo da fotossíntese como pigmentos fotoprotectores. Nos cromoplastos, eles são depositados na forma cristalina (ex: tomate e cenoura) ou como gotas de óleo (ex: manga e paprica) (Kurz *et al.*, 2008).

Os tecidos de plantas comestíveis contêm uma ampla variedade de carotenóides, os exemplos mais comuns são: tomate (licopeno), cenoura (α - e β -caroteno), milho (luteína e zeaxantina), pimento vermelho (capsantina) e batata doce (β -caroteno) (Figura 5). O conteúdo de carotenóides nas frutas e vegetais depende de vários factores, tais como: variedade genética, estado de maturação, armazenamento pós-colheita, processamento e confecção (Capecka *et al.*, 2005).

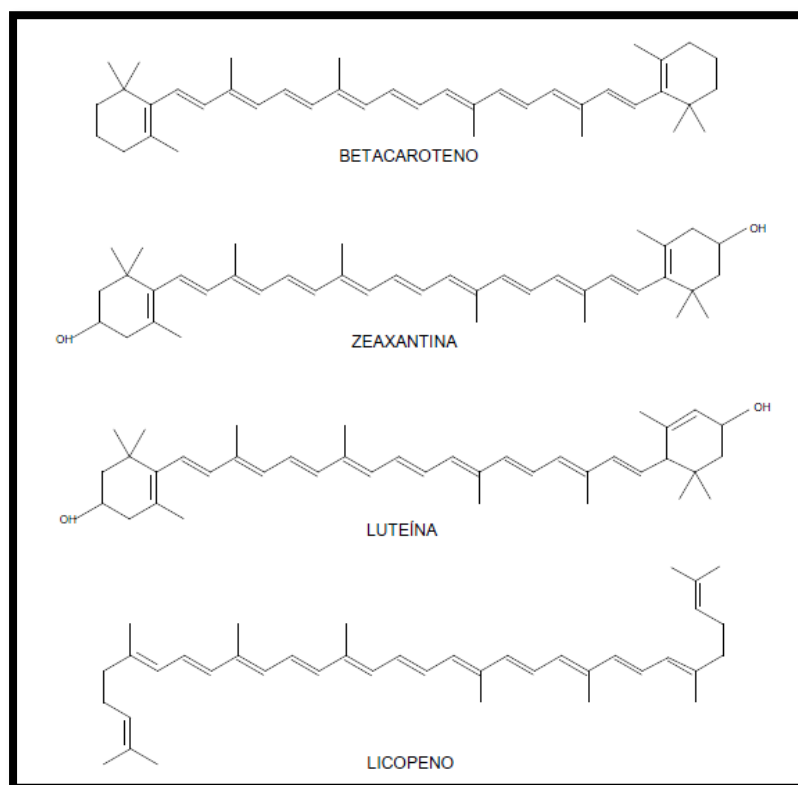


Figura 5 - Estruturas moleculares de alguns carotenóides encontrados nos vegetais.

Dos cerca de 600 carotenóides identificados, apenas alguns são encontrados em tecidos humanos, entre os quais o licopeno e β -caroteno, e as xantofilas, luteína e zeaxantina.

2.2 Importância para a saúde

Nos últimos anos, uma atenção crescente tem sido dedicada ao papel da dieta na saúde humana. Vários estudos epidemiológicos indicam que a elevada ingestão de produtos vegetais está associada a uma redução no risco de uma variedade de doenças crónicas.

Estes efeitos têm sido particularmente atribuídos aos compostos que possuem actividade antioxidante. Como referido anteriormente, os principais antioxidantes nos vegetais são as vitaminas C e E, os carotenóides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides. Estes antioxidantes absorvem radicais livres e inibem a cadeia de iniciação ou interrompem a cadeia de propagação das reacções oxidativas promovidas pelos radicais.

A acção benéfica dos compostos fenólicos na saúde humana está relacionada com a sua actividade antiinflamatória e com a actividade que impede, não só a aglomeração das plaquetas sanguíneas, mas também a acção de radicais livres sobre o organismo. Uma vez que estes compostos protegem moléculas como o DNA, podem inibir o desenvolvimento de determinados processos cancerígenos (Harbone e Williams, 2000). A ingestão de flavonóides está associada à longevidade e à redução na incidência de doenças cardiovasculares (Araújo, 2008).

Por outro lado, houve um crescente interesse no estudo dos flavonóides após a descoberta da relação que havia entre o elevado consumo de gorduras e a baixa taxa de mortalidade cardiovascular, isto associado ao consumo de vinho tinto – *French Paradox*, na população mediterrânea. Assim, o poder antioxidante apresentado pelos flavonóides promove a eliminação de radicais livres e consequente protecção contra a oxidação lipídica, podendo interferir no desenvolvimento da aterosclerose, reduzindo deste modo trombooses e promovendo o normal funcionamento do endotélio (Erdman, 2005; Díaz-Reinoso, 2007).

Para além do referido, estudos epidemiológicos confirmam que os flavonóides são compostos promotores de saúde, já que exercem acções protectoras contra patologias crónicas e neuro degenerativas, diabetes, inflamações, alergias e mutações genéticas, bem como apresentam propriedades antimicrobianas, antivirais, analgésicas e hépato-protectoras (Patel, 2008; Cartea, 2011).

No que respeita os carotenóides, o organismo humano não é capaz de sintetizar estes compostos, desta forma eles são obtidos exclusivamente da dieta alimentar. Algumas das principais fontes de carotenóides são cenoura e abóbora (β -caroteno), tomate e produtos derivados, como, polpa e molhos (licopeno) (Silva e Naves, 2001; Moritz e Tramonte, 2006). Estudos apontam que a função antioxidante dos carotenóides desempenha um papel importante na redução do risco de doenças cancerígenas, cataratas, aterosclerose e no processo de envelhecimento (Damodaran *et al.*, 2008).

O β -caroteno é o carotenóide que possui maior actividade de pró-vitamina A e é encontrado em diversos vegetais como cenoura, abóbora, manga e mamão (Damodaran *et*

al., 2008). Street *et al.* (1994) relataram uma significativa associação entre baixas concentrações de β -caroteno no plasma e o aumento da incidência de enfarte do miocárdio. Uma dieta rica em β -caroteno é associada ao menor risco de morte prematura devido às doenças coronárias (Bellizi *et al.*, 1994).

Luteína e zeaxantina são xantofilas resultantes do processo de hidroxilação de α - e β -caroteno, respectivamente, que possuem igualmente actividade de pró-vitamina A. Durante a maturação dos frutos, a conversão a luteína e zeaxantina provoca uma diminuição nos níveis de α - e β -caroteno. Estudos epidemiológicos e clínicos mostraram que baixa ingestão ou baixa concentração destes carotenóides no plasma está associada a degeneração macular, por isso, o benefício destes dois carotenóides para a visão do ser humano é muito importante. Por outro lado, estudos recentes sugerem que estes compostos podem manter o coração saudável pois contribuem para a redução dos riscos de doenças cardiovasculares e, também, protegem a pele dos danos causados por radiação UV (Marinova e Ribarova, 2007; Santocono *et al.*, 2007).

Licopeno é um isómero acíclico do β -caroteno, com actividade de pró-vitamina A e que está presente em diversas frutas e vegetais. O licopeno é um dos mais potentes captadores de oxigénio singleto entre os carotenóides naturais e funciona como um antioxidante muito potente. Além disso, ele é capaz de reduzir a mutagénese e, em concentrações fisiológicas, pode inibir o crescimento de células cancerígenas (Blum *et al.*, 2005; Scolastici *et al.*, 2007).

3 Indução fenólica nos tecidos vegetais

As plantas possuem um metabolismo extremamente eficiente no que respeita a sua defesa. Este metabolismo é composto por metabolismo primário e metabolismo secundário (Taiz e Zeiger, 2009).

No metabolismo primário incluem-se as moléculas básicas para o bom funcionamento das células: aminoácidos, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Já no metabolismo secundários são produzidas outras substâncias que não são consideradas básicas na estrutura celular, mas que normalmente se encontram em tecidos e órgãos específicos da planta, ou ainda, nas diferentes fases de desenvolvimento desta (Hopkins e Huner, 2004).

Os metabolitos secundários são sintetizados por todas as plantas e esta característica foi desenvolvida devido à necessidade de adaptação a novos meios e competição com outras plantas assegurando a sua sobrevivência e, para ajudar na defesa e protecção contra stress biótico ou abiótico (Erkan *et al.*, 2008; Taiz e Zeiger, 2009).

O stress abiótico pode ser provocado de várias maneiras, entre as quais o corte, fito-hormonas, temperatura, radiação ultravioleta, choque térmico, stress hídrico, hiperotoxia, entre outros. Estes factores vão afectar o metabolismo secundário das plantas, promovendo assim o aumento da síntese de compostos com actividade nutracêutica ou reduzir a síntese de compostos indesejáveis (Cisneros - Zevallos, 2003).

Este stress afecta vias envolvidas na biossíntese dos três principais grupos de metabolitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Estes compostos actuam na planta como defesas contra herbívoros e patogénicos, como atractivos para polinizadores e animais de dispersão de sementes (Gershenzon, 1998).

Os stresses abióticos são utilizados em actividades de pós-colheita como tradicional ferramenta para prolongar a vida útil do produto, actuando principalmente ao nível de cor, textura, sabor e capacidade de conservação. Por outro lado, plantas sintetizam metabolitos secundários com potencial aplicação em alimentos funcionais, suplementos dietéticos, produtos farmacêuticos, cosméticos e mercado de agro-químicos (Jacobo - Velázquez *et al.*, 2011).

No entanto, nem todos os stresses abióticos tendem a ser benéficos. Alguns tratamentos de stress podem induzir a perda de compostos bioactivos ou a produção de

compostos indesejáveis. Por exemplo, o etileno pode induzir a síntese de um composto amargo, isocumarina, na cenoura (Lafuente *et al.*, 1996).

Assim, a presença de um sinal de stress, a intensidade do stress, uma resposta de saturação do tecido, nível de maturação, cultivar, tempo, temperatura, ou os níveis de fenólicos iniciais dentro dos tecidos podem ser factores importantes na resposta ao stress abiótico (Reay e Lancaster, 2001).

Portanto, surge a necessidade de compreender como diferentes stresses accionam as enzimas específicas envolvidas na síntese do composto-alvo, bem como a possível interacção entre os diferentes stresses e a resposta do tecido. O ideal seria utilizar o stress controlado de modo a promover a síntese de metabolitos secundários para obter uma composição nutracêutica desejável, com baixa síntese de compostos indesejáveis, evitando a mudança na qualidade do produto (Cisneros - Zevallos, 2003).

O corte é um dos stresses abióticos que produz sinais que se propagam dos tecidos feridos para os não feridos e por outro lado, induz a síntese de proteínas específicas. Uma das alterações determinantes induzidas pelo corte é a activação do metabolismo fenilpropanóide que resulta na acumulação de compostos fenólicos e consequente escurecimento dos tecidos. O escurecimento de frutas e hortícolas frescos tem impacto negativo na qualidade (Shewfelt, 1987) e é um factor limitante na vida útil do produto (Couture *et al.*, 1993). No entanto, no caso de tecidos como a cenoura, o escurecimento não provoca uma alteração sensorial significativa, pelo que a produção de compostos fenólicos constitui uma vantagem.

Com o conhecimento das vantagens dos compostos fitoquímicos para a saúde humana, a engenharia genética tem vindo a obter estes compostos incidindo sobre a genética da planta. No entanto, o uso de plantas geneticamente modificadas é limitado, porque na maioria dos casos elas são consideradas com potencial biológico perigoso que cria desequilíbrio ecológico.

Tendo isto em conta, alternativas tecnológicas são necessárias para utilizar as plantas para a produção de compostos bioactivos. Como já foi visto, a aplicação de stress abiótico na pós-colheita de frutos e vegetais frescos induz a acumulação de antioxidantes. Assim, esta abordagem pode ser explorada como uma alternativa à manipulação genética (Figura 6).

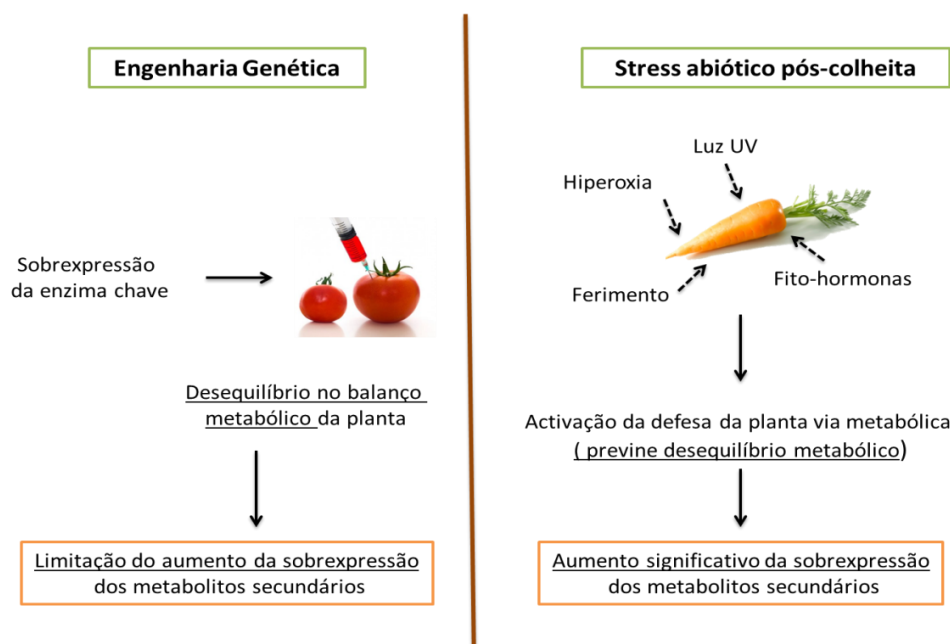


Figura 6 - Comparação entre engenharia genética e stress abiótico pós-colheita na estratégia de sobreexpressão de metabolitos secundários (**Fonte:** Jacobo-Velázquez, 2012).

Pela observação da Figura 6, pode-se dizer que o uso do stress abiótico é uma tecnologia prática e eficiente que permite acumular antioxidantes na planta. Entre os antioxidantes produzidos e acumulados em resposta ao stress, os compostos fenólicos têm sido identificados como aqueles que possuem maior potencial para proteger de diversas doenças degenerativas (Vinson *et al.*, 2001; Heo *et al.*, 2007).

Stress Abiótico aplicado a cenoura

Nos estudos realizados com cenoura o stress abiótico aplicado demonstrou verificar-se um incremento de compostos fenólicos bastante favorável.

Segundo Reyes *et al.* (2007) a aplicação do stress induzido pelo corte activa o mecanismo metabólico da cenoura. A acumulação de compostos fenólicos nos tecidos da cenoura foi maior quanto mais intenso foi o corte. Além disso, os autores observaram que etileno (ET), metil jasmonato (MJ), luz UV ou hiperoxia, aplicado aos tecidos feridos da cenoura aumenta ainda mais a acumulação de compostos fenólicos. Heredia e Cisneros-Zevallos (2009) verificaram que o stress aplicado pelo corte aumenta cerca de 75 % o teor em fenólicos contido na cenoura ripada que foi armazenada 6 dias a 15 ° C. Porém, este aumento em compostos fenólicos foi ainda mais evidente quando aplicado o MJ (250 ppm) e ET (1 000 ppm), que conduziu a aumentos de 150 e 200 % respectivamente.

Também Jacobo-Velázquez *et al.* (2011) submeteram a cenoura a condições extremas de corte em combinação com hiperoxia (80 % de O₂). Com isto, os autores

observaram que quando cenouras picadas são armazenadas a 20 °C em condições de hiperoxia o conteúdo fenólico nos tecidos aumenta em 550 % depois de 48 horas de armazenamento. Os autores estabeleceram ainda que quando a cenoura picada é sujeita a hiperoxia produz 90 % mais de compostos fenólicos do que se for sujeita a atmosfera normal.

O ácido clorogénico (AC) é um composto fenólico que é acumulado em quantidades elevadas como resposta ao stress pela lesão dos tecidos da cenoura. Este composto fenólico é amplamente absorvido e metabolizado pelos seres humanos e possui aplicações farmacêuticas importantes. Estudos clínicos demonstraram que AC pode ser utilizado para diminuir a absorção da glucose e reduzir a acumulação de gorduras (Thom, 2007). Também actua contra o vírus da hepatite B e inibe efeitos na progressão do tumor cerebral (Belkaid *et al.*, 2006). A concentração de AC na cenoura pode ter um aumento significativo de 16,2 mg.kg⁻¹ para 440 – 920 mg.kg⁻¹ se for aplicado o stress pelo corte (Jacobo-Velázquez *et al.*, 2011).

II. Desenvolvimento Experimental

4. Materiais e Métodos Analíticos

4.1 Material Vegetal

Os subprodutos de cenoura (*Daucus carota*, L.) da cv. Nantes utilizados neste trabalho foram cedidos pela empresa *Campotec* - Comercialização e Consultadoria Hortofrutícolas SA, proveniente da linha de processamento de cenoura da IV Gama (cenoura ripada) representado esquematicamente na Figura 7.



Figura 7 - Diagrama geral do processamento mínimo de hortofrutícolas com indicação dos locais/operações (a laranja) onde é descartado o material vegetal que vai constituir os subprodutos.

Os subprodutos de cenoura são um material heterogéneo constituído por diversas partes desta matéria-prima, descartadas em diferentes fases da linha de produção de cenoura ripada (Figura 8) incluindo: extremidades da raiz, cascas, pedaços de cenoura e/ou

cenouras inteiras consideradas não conformes para laboração. O material recepcionado foi congelado (-18 °C) até ser analisado.



Figura 8 - Matéria-prima: subprodutos de cenoura minimamente processada.

4.2 Métodos analíticos

4.2.1 Preparação das amostras

Para a constituição das amostras, os subprodutos foram descongelados e divididos de forma aleatória de modo a constituir grupos homogêneos e representativos da amostra inicial.

4.2.2 Cor CIELab

Os parâmetros da cor foram determinados com o auxílio do colorímetro CR 300 Minolta Colorimeter (Osaka, Japan), no sistema CIELab (iluminante C). A calibração do colorímetro efectuou-se a partir do padrão de referência ($L^* = 97,10$; $a^* = 0,08$; $b^* = 1,80$). Previamente às leituras da cor, o homogeneizado de amostra foi colocado em placas ($\phi = 4,3$ cm). Os resultados expressam a média de 15 determinações por amostra.

Por leitura directa no aparelho obtiveram-se os parâmetros L^* , a^* e b^* , onde L^* representa a luminosidade da amostra (intervalo de variação entre 0 – preto e 100 – branco), o parâmetro a^* traduz as variações de cor entre vermelho (+60) e verde (-60) e o parâmetro b^* as variações entre amarelo (+60) a azul (-60). A aproximação das coordenadas a^* e b^* ao valor nulo indica cores neutras como o branco, o cinzento e o preto.

Para além dos parâmetros $L^*a^*b^*$, foram ainda calculadas a saturação ou cromaticidade da cor C^* , a tonalidade h° (Hue) e o índice de escurecimento (WI).

A cromaticidade C^* (Eq. 1) é uma medida do croma ou da saturação da cor e representa a distância ao eixo neutro. O atributo de cor Hue (h° , Eq. 2 a 4) pode ser definido como o ângulo (0 - 360°) que transmite a tonalidade de cor. Os ângulos formados variam pelos eixos dos parâmetros a^* e b^* , definindo assim a tonalidade da cor, sendo que ângulos entre 0° e 90° correspondem aos vermelhos, laranjas e amarelos; de 90° a 180° os amarelos, amarelo-verdes e verdes; de 180° a 270° os verdes, cianos e azuis; de 270° a 360° os azuis, púrpuras, magentas e novamente os vermelhos (Dafne, 2007).

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$h^\circ = \frac{(\arctg \frac{b^*}{a^*})}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* > 0 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$h^\circ = 180 + \frac{(\arctg \frac{b^*}{a^*})}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^* < 0 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$h^\circ = 360 + \frac{(\arctg \frac{b^*}{a^*})}{6.2832} \times 360, \text{ se } a^* > 0 \text{ e } b^* < 0 \quad (\text{Eq. 4})$$

Segundo Bolin e Huxsoll (1991), o índice de escurecimento (*Whiteness Index*, WI) é o parâmetro que traduz a maior ou menor presença de branco à superfície da amostra, de acordo com a escala apresentada na Tabela 2, sendo calculada pela seguinte expressão:

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Tabela 2 - Classificação do nível de escurecimento (WI) da amostra.

WI (%)	Nível de escurecimento
0	Não branco
3,3 – 8,3	Ligeiramente branco
8,3 – 25	Moderadamente branco
25 – 50	Distintamente branco
50 – 100	Extremamente branco

Fonte: Bolin e Huxsoll (1991).

4.2.3 pH

O valor de pH foi medido no homogeneizado da amostra em água destilada (1:1, p:p), utilizando um potenciómetro (Crison Micro pH 2001, Crison Instruments, Espanha). Os valores médios resultaram de 3 determinações por amostra.

4.2.4 Teor de Sólidos Solúveis (TSS)

O teor em sólidos solúveis foi determinado no homogeneizado da amostra, utilizando um refractómetro digital (DR-A1, ATAGO Co Ltd., Japão). Os resultados são expressos em °Brix, representando a percentagem de sólidos solúveis por 100 g de produto, resultantes de 3 determinações por amostra.

4.2.5 Microrganismos Totais a 30 °C

A determinação de microrganismos aeróbios a 30 °C foi realizada de acordo com a norma EN ISO 4833:2003, no laboratório de microbiologia da Unidade de Investigação e Tecnologia Alimentar do INIAV.

4.2.6 Conteúdo Fenólico Total

A técnica utilizada para a determinação do conteúdo fenólico total teve por base o método descrito por Swain e Hillis (1959). Este método baseia-se numa reacção colorimétrica promovida pelo reagente *Folin-Ciocalteu*.

Para a construção das curvas de calibração foram utilizadas duas soluções: ácido clorogénico e ácido gálico (1 000 mg/L). A partir destas soluções foram determinados os pontos de concentração de 50 a 325 mg/L (Figura 9) e de 50 a 700 mg/L (Figura 10).

Inicialmente procedeu-se à extracção dos compostos fenólicos das amostras. O extracto foi obtido através da homogeneização de 5 g de amostra em 20 mL de metanol,

utilizando um polytron Yellow line DI 25 basic (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Alemanha) seguido de incubação durante 24 horas a 5 °C.

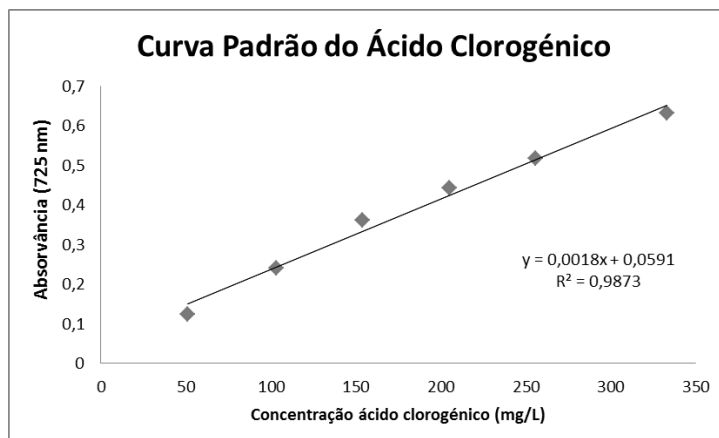


Figura 9 - Curva de calibração do ácido clorogénico para determinação de compostos fenólicos.

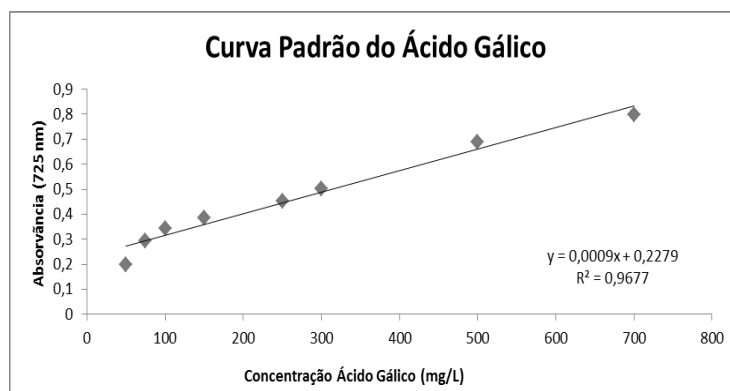


Figura 10 - Curva de calibração do ácido gálico para determinação de compostos fenólicos.

Após a obtenção do extracto límpido por centrifugação a 29 000 rpm durante 15 min a 4 °C (RC5C Sorvall Instruments, rotor n. SS-34), 150 µL do extracto metanólico foram diluídos em 2 400 µL de água nanopura, seguido pela adição de 150 µL do reagente de *Folin-Ciocalteu* a 0,25 N. Após permitir a reacção da mistura por 3 min, foram adicionados 300 µL Na_2CO_3 a 1 N, incubando a mistura final durante 2 horas no escuro (temperatura ambiente). As leituras espectrofotométricas a 725 nm foram obtidas utilizando um espectrofotómetro ATI Unicam UV/VIS 4 (Unicam Sistemas Analíticos, Lisboa, Portugal). O conteúdo fenólico total foi expresso em mg de equivalentes de ácido clorogénico e ácido gálico.100 g⁻¹ de amostra, resultantes da média de 3 determinações por amostra.

Nos ensaios de optimização das condições de extracção dos compostos fenólicos foi utilizado o método descrito por Ribereau Gayon (1968), leitura da absorção a 280 nm, por

ser mais expedito (Figura 11). Neste caso o conteúdo fenólico foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico.g⁻¹ de amostra, resultantes da média de $n \geq 3$ determinações por amostra.

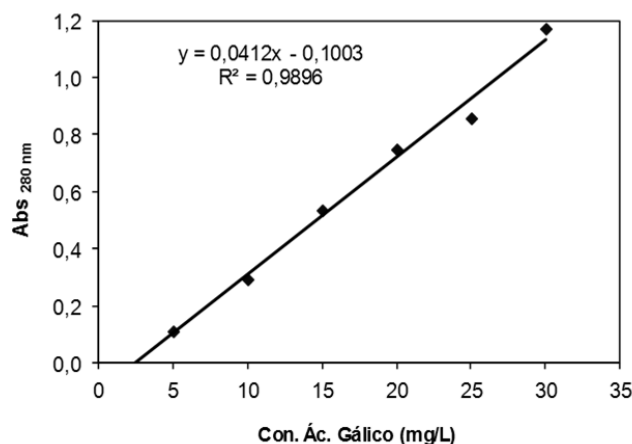


Figura 11 – Curva de calibração de ácido gálico para determinação directa de compostos fenólicos.

4.2.7 Determinação do perfil fenólico e quantificação do ácido clorogénico

A determinação do perfil e identificação dos compostos fenólicos foi efectuada por HPLC-DAD segundo o método adaptado de Petitjean-Freytet *et al.*, (1991) utilizando os extractos obtidos para a determinação do teor fenólico total descrito anteriormente. Todas as determinações foram conduzidas à temperatura ambiente num sistema Alliance System da Waters (Waters 2690 Separations Module, Milford, MA, USA), equipado com um detector Photodiode array (PDA) (Waters 996, Milford, MA, USA). A coluna utilizada foi uma NovaPack C18 (3.9 mm x 300 mm, 4 µm, C18 reverse-phase column, Waters NovaPack, Milford, MA, USA). O tempo total de corrida foi de 60 min, sendo as amostras (e padrões externos) eluídas (volume de injeção de 20 µL) de acordo com o programa de gradiente não linear que se descreve: 0/88, 5/88, 10/85, 35/70, 40/50, 50/50, 88/55, 88/60 (min/% solvente A) com um fluxo de 1 mL.min⁻¹. A composição da fase móvel utilizada foi de água (solvente A) e acetonitrilo:água (80:20, v:v) (solvente B), sendo o pH das soluções ajustado a 2,3 com ácido fórmico. A aquisição de dados e integração foi realizada pelo *software* Waters Millennium 3.2 (Milford, MA, USA), com extracção de cromatograma a 280 nm e 340 nm. A identificação e pureza dos picos foi realizada por comparação espectral (190 a 600 nm, largura de banda de 1,2 nm) e tempo de retenção comparativamente a padrões externos (50 µg.mL⁻¹).

A quantificação do ácido clorogénico foi realizada face à calibração externa (área do pico) com o respectivo padrão (4,99 a 104 µg.mL⁻¹), cuja recta de calibração foi validada ($y =$

$2337,4 \times = 8753,6$; $r^2 = 0,999$) e apresenta como limites de detecção e quantificação 3,98 e $12,06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente.

4.2.8 Determinação do conteúdo em carotenóides totais

A técnica utilizada para a determinação do conteúdo carotenóide total teve por base o método descrito por Talcott e Howard (1999). As amostras (2 g) foram homogeneizadas em 20 ml de acetona:etanol (1:1, v:v) contendo $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de butil-hidroxi-tolueno (BHT) (solução de extracção), utilizando um Polytron Yellow line DI 25 basic (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Alemanha). Posteriormente procedeu-se à lavagem do homogeneizado obtido, por filtração e lixiviação, com a solução de extracção até que nenhuma alteração de cor adicional fosse observada, perfazendo um volume final de 100 mL. A este extracto adicionou-se 50 mL de n-hexano, permitindo-se a reacção por 30 minutos, ao fim dos quais se adicionou 25 mL de água nanopura para permitir a separação de fases. A fase orgânica foi recolhida e submetida a leituras espectrofotométricas a 470 nm utilizando um espectrofotómetro ATI Unicam UV/VIS 4 (Unicam Sistemas Analíticos, Lisboa, Portugal). Os resultados são expressos em mg de equivalentes de β -caroteno. 100 g^{-1} , resultantes da média de $n \geq 3$ determinações por amostra.

4.2.9 Quantificação do teor em β -caroteno

O teor em β -caroteno foi determinado por HPLC nos extractos obtidos para a determinação do teor em carotenóides total descrito anteriormente. Todas as determinações foram conduzidas à temperatura ambiente sendo a separação conduzida numa coluna Nova-Pak Silica column (3,9 mm x 150 mm; $4 \mu\text{m}$). As amostras foram injectadas no sistema com recurso a um injector Rheodyne manual (Model 7125) equipado com um *loop* de $50 \mu\text{L}$ (volume de injeção) sendo a fase móvel constituída pela mistura de n-hexano:isopropanol (99:1, v:v) e o fluxo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ para um tempo total de corrida de 10 minutos. Padrões comerciais de β -caroteno foram utilizados para a identificação dos picos cromatográficos comparando os respectivos tempos de retenção e espectros UV-Vis (Waters 2996 Photodiode array detector), sendo a respectiva quantificação obtida a partir do cromatograma extraído a 450 nm com base numa curva de calibração externa (0 - $10 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$).

4.2.10 Actividade Antioxidante

A determinação da actividade antioxidante foi realizada por dois métodos: o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e o método FRAP (Método de Redução do Ferro). No primeiro método foi utilizado o Trolox, sendo equivalente à vitamina E, como substância padrão. Foi estabelecida uma curva padrão com oito pontos de concentração entre 50 e 800 μM (Figura 12). No segundo método o Sulfato Ferroso (FeSO_4) foi utilizado como padrão. Neste método a curva padrão foi estabelecida com quatro pontos entre 500 e 2 000 μM (Figura 13). A etapa de extracção para estes métodos, foi idêntica à realizada na determinação de compostos fenólicos.

Captação do radical livre DPPH

A técnica utilizada para a determinação da actividade antioxidante pelo método de captação do radical livre DPPH foi adaptado de Larrauri *et al.* (1997).

O radical utilizado foi o DPPH, que apresenta uma coloração violeta em solução de metanol e que, ao ser colocado em contacto com a amostra a analisar, é consumido, de acordo com o poder antioxidante dessa amostra, alterando gradualmente a sua cor para amarelo. Assim, quanto maior o poder antioxidante da amostra, mais radical será consumido e, conseqüentemente, menor será a absorvância da amostra.

Neste método foram preparadas duas soluções: uma solução-mãe de DPPH e uma solução diária de DPPH. A solução-mãe deve ser preparada, pelo menos, 2 horas antes da medição e não deve ser utilizada por um período superior a 5 dias, sendo armazenada a 4 °C. A solução diária foi preparada a partir da solução anterior, para ser utilizada de imediato. Esta solução diária é preparada para a calibração do valor de absorvância, uma vez que esta solução tem como requisito não ultrapassar a absorvância de 1,1. A reacção ocorre em frascos âmbar, para evitar qualquer alteração proveniente da luminosidade.

Assim, a cada frasco foram adicionadas 4 mL de solução diária e 150 μL de amostra. Deixou-se incubar durante 40 minutos no escuro à temperatura ambiente. Ao fim desse tempo, procedeu-se a leitura da absorvância em espectrofotómetro (GBC UV/VIS 916) com um comprimento de onda de 517 nm.

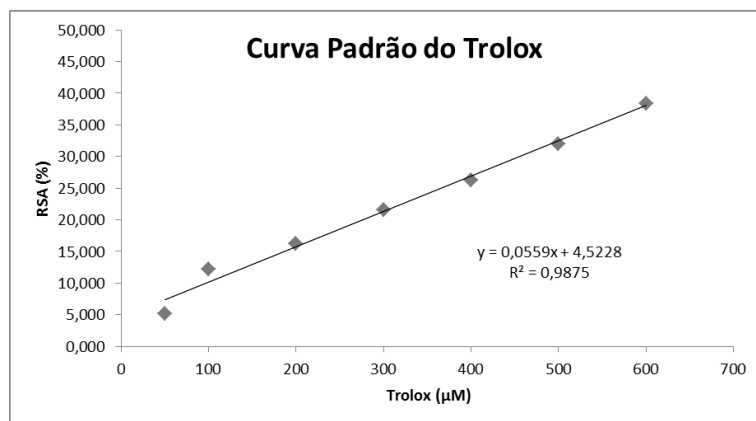


Figura 12 - Curva de calibração do método DPPH.

Para além da leitura da absorvância da mistura “amostra + radical” ($A_{amostra}$) é ainda realizada uma leitura de absorvância apenas com radical como ensaio em branco (A_{DPPH}).

Todas as leituras foram realizadas em triplicado de forma a obter resultados mais fiáveis.

Com os valores de absorvância obtidos é possível determinar o RSA (*Radical Scavenging Activity*) (Eq. 6), expresso em percentagem:

$$RSA (\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{amostra}}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

Para o cálculo de μM de Trolox, utilizou-se a recta de calibração obtida: $y = m x + b$ e através desta equação é possível converter os valores de RSA para Trolox (Eq. 7) (μM):

$$Trolox (\mu\text{M}) = \frac{RSA - b}{m} \quad (\text{Eq. 7})$$

Os resultados finais utilizados para a avaliação da actividade antioxidante são expressos em *TEAC* (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) que é definida como a concentração de antioxidante que tem a mesma actividade de 1 mM de Trolox (Silva *et al.*, 2010). Assim, quanto maior for o valor de *TEAC* maior é a actividade antioxidante da amostra.

O *TEAC* (Eq. 8) é calculado da seguinte forma:

$$TEAC = \frac{Trolox (\mu M)}{\mu L \text{ de amostra}} \text{ (Eq. 8)}$$

Redução do Ião Férrico (FRAP)

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) baseia-se na redução do complexo férrico-tripiridiltiazina (Fe^{3+} -TPZ) ao complexo ferroso (Fe^{2+} -TPZ), na presença de um antioxidante em condições ácidas. O complexo formado por esta reacção possui uma coloração azul intensa (Rufino *et al.*, 2006).

Para este método foi necessário preparar previamente as seguintes soluções: solução de HCL 40 mM, solução tampão acetato 0,3 M, solução de cloreto de ferro, solução TPTZ 10 mM e por fim solução do reagente FRAP.

Em ambiente escuro, foram transferidos 90 μ L da amostra para os tubos de ensaio, onde, acrescentaram-se 270 μ L de água destilada e por fim 2,7 mL da solução FRAP, sendo tudo homogeneizado no vórtex e colocado em banho-maria a 37 °C durante 30 minutos.

Ao fim do tempo mencionado, procedeu-se a leitura da absorvância, em triplicado, a um comprimento de onda de 595 nm, onde o reagente FRAP foi utilizado como branco para calibrar o equipamento.

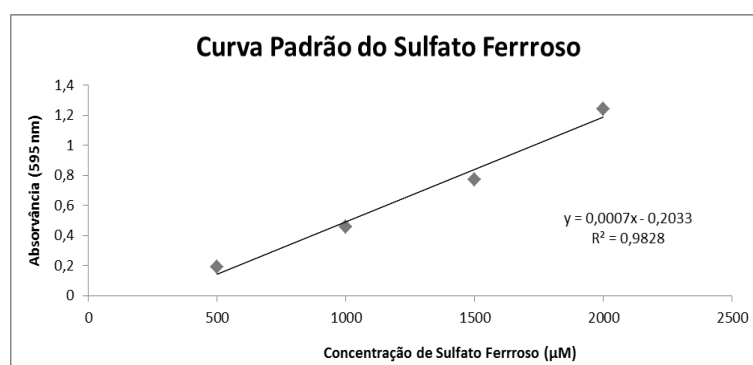


Figura 13 - Curva de calibração do método FRAP.

Para calcular a actividade antioxidante total, utilizou-se a equação da recta a absorvância equivalente a 1 000 μ M de sulfato ferroso e os resultados foram expresso em μ mol de sulfato ferroso.

4.2.11 Determinação dos teores de água e matéria seca

A determinação do teor de água e de matéria seca foi realizada segundo a norma portuguesa - NP 2966 (1993).

5. Caracterização Qualitativa da Composição Bioactiva de Subprodutos de Cenoura

Os teores totais de compostos fenólicos e de carotenóides presentes em subprodutos de cenoura expressam valores (Baeta, 2014) passíveis de encará-los como potencial matriz para a extracção de fitoquímicos com actividade antioxidante. No entanto, é necessário ainda identificar e quantificar a natureza específica dos compostos veiculados nas duas vertentes.

Os resultados esperados assentam no pressuposto de que os compostos fenólicos e carotenóides identificados nos subprodutos de cenoura justificam a aposta na respectiva recuperação enquanto fitoquímicos com capacidade antioxidante.

5.1 Delineamento experimental

A partir de um lote inicial (cerca de 5 kg) de subprodutos (após descongelação a temperatura controlada, 5 °C) foram constituídas aleatoriamente amostras (100 g cada) para a caracterização dos seguintes atributos: pH, TSS, teor fenólico total e respectivo perfil (HPLC-DAD), teor total de carotenóides e quantificação de β -caroteno por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC).

5.2 Resultados e Discussão

5.2.1 pH e TSS

O valor de pH dos subprodutos é 4,9, ou seja, os subprodutos de cenoura apresenta um carácter ácido mas que não é inteiramente limitativo para o desenvolvimento de microrganismos patogénicos. O teor em sólidos solúveis apresenta valores de 6,9 °Brix.

5.2.2 Composição Bioactiva (teores totais de fenólicos e de carotenóides)

Na Tabela 3 estão apresentados os teores totais médios em compostos fenólicos (CFT) e em carotenóides (CCT) dos subprodutos de cenoura, bem como a quantificação de ácido clorogénico (ácido fenólico) e de β -caroteno obtida através da análise cromatográfica dos extractos fenólicos e carotenóides, respectivamente.

Tabela 3 - Teores totais médios de compostos fenólicos (CFT), carotenóides (CCT) (\pm DP), ácido clorogénico e β -caroteno (\pm DP) de subprodutos de cenoura.

Determinação	Média \pm DP
Teor fenólico total (mg EAC.100 g⁻¹)	46,4 \pm 2,9
Ácido clorogénico ¹ (mg.100 g ⁻¹)	2,88 \pm 0,11
Teor carotenóide total (mg eq. β-caroteno.100 g⁻¹)	11,8 \pm 0,2
β -caroteno ² (mg.100 g ⁻¹)	7,86 \pm 0,45

1 – Quantificação em ácido clorogénico (t_r = 8,897 min; λ_{\max} = 243,3; 326,1 nm) efectuada a partir de recta de calibração externa a 340 nm. 2 – Quantificação em β -caroteno (t_r = 1,267 min; λ_{\max} = 450 nm) efectuada a partir de recta de calibração externa a 450 nm.

O conteúdo total em compostos fenólicos caracterizados nos subprodutos de cenoura de 46,4 \pm 2,9 mg EAC.100 g⁻¹ (Tabela 3), encontra-se na gama de valores referenciados para a respectiva matéria-prima da variedade Nantes de 24,4 - 93,2 mg EAC.100 g⁻¹ (Alegria *et al.*, 2012; Silva, 2013). No âmbito deste estudo, cabe referir que o conteúdo fenólico caracterizado é superior ao referido por Baeta (2014) - 30,4 mg EAG.100 g⁻¹, para o mesmo tipo de subprodutos.

A avaliação do perfil fenólico dos subprodutos de cenoura apresenta-se na Figura 14. É conhecida uma concentração fenólica superior na epiderme (casca) deste hortícola (Mercier *et al.*, 1994) e os compostos fenólicos predominantes pertencem à classe dos ácidos, particularmente os ácidos hidroxicinâmicos. Nesta composição, destaca-se a prevalência do ácido clorogénico como principal composto fenólico encontrado em cenoura, representando 42-62 % dos compostos fenólicos identificados (Alasalvar *et al.*, 2001; Zhang e Hamauzu, 2004).

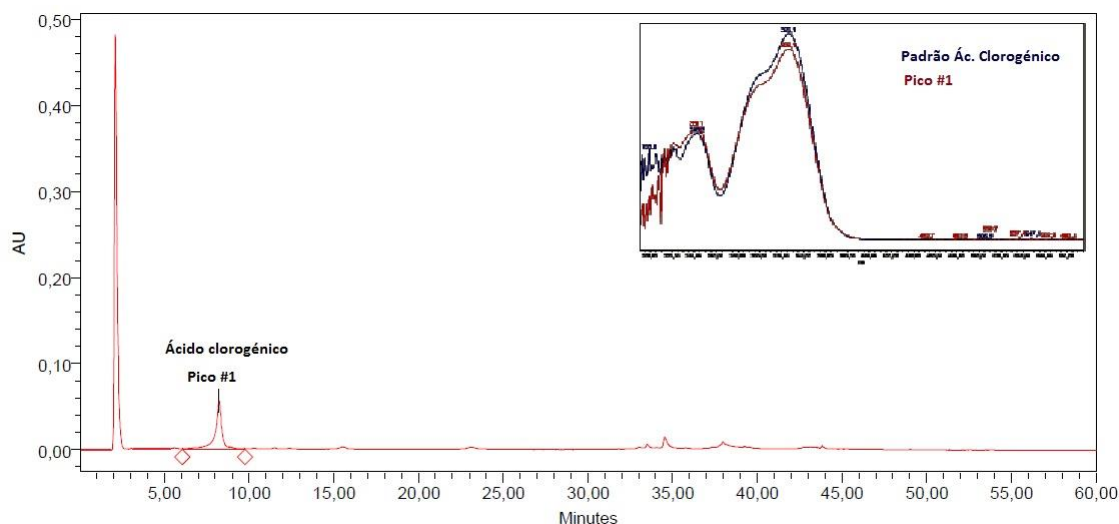


Figura 14 - Perfil fenólico característico dos subprodutos de cenoura obtido por HPLC-DAD. Cromatograma extraído a 340 nm, com identificação do ácido clorogénico ($tr_{\text{padrão}} = 8,897 \text{ min}$; $\lambda_{\text{max}} = 243,3; 326,1 \text{ nm}$) e respectivo espectro comparado com padrão puro.

De facto e face ao perfil fenólico obtido, o ácido clorogénico foi o único composto fenólico encontrado nos extractos de subprodutos como atesta o cromatograma apresentado na Figura 14, sendo o mesmo quantificado em $2,88 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (Tabela 3). O quantitativo determinado em ácido clorogénico foi superior ao referenciado por Jacobo-Velazquez e Cisneros-Zevallos (2012), de $1,62 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, não sendo no entanto referida a variedade da cenoura. O quantitativo superior encontrado poderá ser justificado pelo contributo das cascas, fracção também representativa no subproduto caracterizado. A predominância deste composto nos subprodutos confere em grande medida um elevado potencial antioxidante a esta matriz e justifica a utilização destes subprodutos como fonte privilegiada para a extracção deste composto em particular.

O conteúdo total em carotenóides caracterizados nos subprodutos de cenoura, de $11,8 \text{ mg eq. } \beta\text{-caroteno} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (Tabela 3) encontra-se na gama de teores referidos para a matéria-prima que lhes dá origem, cenoura, tal como referido por Silva (2013) e Gębczyński (2006) em diferentes variedades de cenoura (cv. Nantes e cv. Koral, respectivamente). Os teores determinados são indicativos do potencial de utilização deste subproduto como fonte de extracção de pigmentos antioxidantes. No entanto, o valor caracterizado é de quase dobro daquele referenciado por Baeta (2014), de cerca de $6 \text{ mg eq. } \beta\text{-caroteno} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$, em subprodutos de cenoura. Esta diferença poderá assim ser demonstrativa da elevada heterogeneidade deste tipo de subproduto, constituído por extremidades da raiz, cascas, pedaços de cenoura e/ou cenouras inteiras consideradas não conformes para laboração,

nomeadamente no que se refere à respectiva proporcionalidade entre os constituintes do subproduto caracterizado em ambos os estudos.

O α - e β -caroteno são os principais carotenóides presentes em cenoura (Simon e Wolff, 1987), sendo o β -caroteno o carotenóide prevalecente na raiz (entre 60 % a 80 % do total de carotenóides). De acordo com este pressuposto, procedeu-se à identificação e quantificação do β -caroteno nos subprodutos, apresentando-se na Figura 15 o respectivo cromatograma obtido a 450 nm.

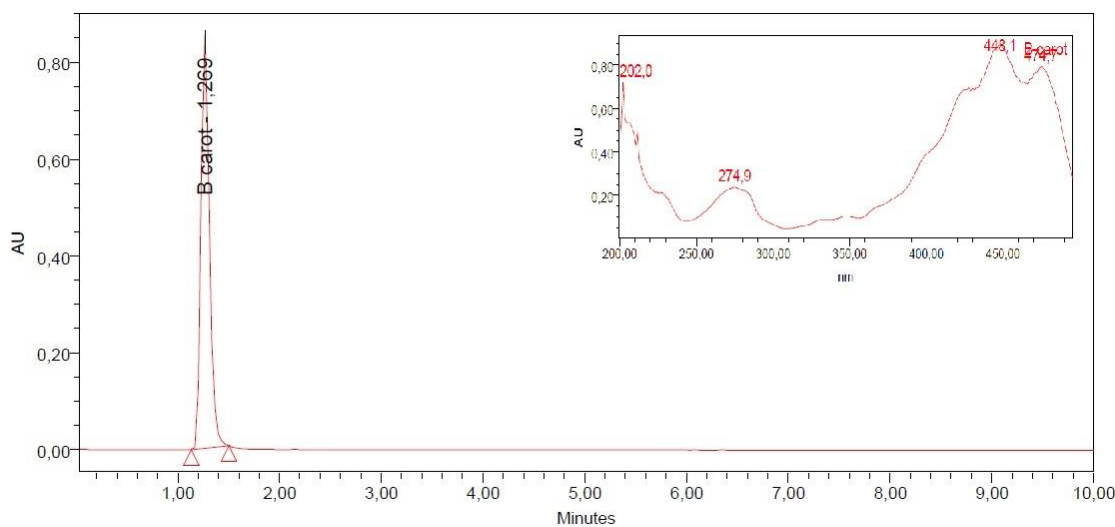


Figura 15 - Identificação do β -caroteno em subprodutos de cenoura obtido por HPLC-DAD. Cromatograma extraído a 450 nm, com identificação do pico de β -caroteno ($t_{r\text{padrão}} = 1,267$ min; $\lambda_{\text{max}} = 450$ nm) e respectivo espectro.

O teor em β -caroteno caracterizado nos subprodutos foi de $7,86 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (Tabela 3), correspondendo este a cerca de 70 % do total em carotenóides caracterizado nesta matriz. Estes resultados confirmam a prevalência de β -caroteno como o carotenóide predominante nos subprodutos de cenoura, reforçando a validade de utilização deste subproduto como fonte de extracção de pigmentos antioxidantes.

5.3 Balanço intercalar

Os subprodutos de cenoura apresentaram potencial de recuperação de compostos bioactivos. De acordo com a caracterização dos subprodutos, os quantitativos em fenólicos totais e em carotenóides demonstram a potencialidade de utilização deste subproduto para a recuperação de compostos antioxidantes, hidrofílicos (fenólicos) e lipofílicos (carotenóides), cujas constituições maioritárias são o ácido clorogénico e β -caroteno.

6. Avaliação da Indução Fenólica ao Corte nos Subprodutos de Cenoura

O corte enquanto factor de stress abiótico actua na promoção da indução fenólica (via fenilpropanóide) durante a armazenagem, podendo duplicar os valores iniciais ao final de 3 dias (5 °C) (Alegria, 2014). O conhecido fenómeno de indução fenólica é proporcional ao aumento da temperatura, no entanto, valores de temperatura superiores à condição de refrigeração (>5 °C) podem conduzir a desenvolvimentos microbianos excessivos (desencadeamento rápido de fermentações) inviabilizando os processos de extracção de compostos fenólicos, nomeadamente quando destinados a fins alimentares. Em consequência, é necessário encontrar uma solução de compromisso entre o aumento do teor fenólico e a estabilidade microbiana dos subprodutos.

Os resultados esperados assentam no pressuposto de que o aumento dos teores fenólicos induzidos pelo corte (trituração) justifica a introdução desta operação (trituração) antes da fase de extracção propriamente dita.

6.1 Delineamento experimental

Para avaliar se a operação de trituração dos subprodutos de cenoura, prévia à fase de extracção, é importante no incremento do teor bioactivo nos subprodutos enquanto potenciais matrizes para a extracção de compostos fenólicos foram testados os efeitos do corte, da temperatura e tempo de armazenagem nos seguintes parâmetros analíticos: cor CIELab, pH, TSS, compostos fenólicos totais (avaliação indirecta da capacidade antioxidante) e contagem de microrganismos totais a 30 °C.

Para tal foram constituídas duas amostras homogéneas de subprodutos a partir de um lote inicial de cerca de 5 kg (após descongelação à temperatura ambiente), em que uma foi mantida nas condições de recepção (Id: SC) e a outra foi triturada (Figura 16), com auxílio do *Rotomix* (velocidade máxima, 3 s) (Id: CC). A matriz de combinação de factores (corte e temperatura de armazenagem), do tipo factorial completa com dois níveis para cada factor - com corte e sem corte; 5 °C e temperatura ambiente, deu origem a 4 tipos de amostras (ca. 200 g) identificadas na Tabela 4. As mesmas foram analisadas aos dias 0, 1 e 3 face ao referido protocolo analítico.



Figura 16 - Subprodutos de cenoura minimamente processada triturados.

Tabela 4 - Condições experimentais do ensaio.

Desenho experimental	Factores		Identificação do tipo de amostras
Factorial completa	Com corte	5 °C	CC - 5
	Com corte	Temperatura ambiente (TA)	CC - TA
	Sem corte	5 °C	SC - 5
	Sem corte	Temperatura ambiente (TA)	SC - TA

6.2 Tratamento e Discussão dos Resultados

Testes: análise de variância ANOVA

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado com recurso ao *Software StatisticaTM v.8.0* da Statsoft (2007), por análise de variância (ANOVA), sendo utilizado o teste Tukey ($p < 0,05$) para separação de médias.

6.2.1 CorCIELab

Na Tabela 5 apresentam-se os resultados da alteração da cor das amostras ao longo de 3 dias de armazenamento, expressas pelas variações do parâmetro a^* e do índice de escurecimento (WI) a traduzir as alterações da tonalidade e o nível de escurecimento dos subprodutos, respectivamente.

Tabela 5 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0, 1 e 3 dias) nos valores médios (\pm DP) dos parâmetros CIELab ($^{\circ}$ h e WI) da cor de amostras de subprodutos de cenoura.

Operação corte	Temperatura armazenamento	Tempo armazenamento	$^{\circ}$ h	WI
SC	5 °C	0	$62,4^a \pm 0,4$	$33,9^a \pm 0,6$
	TA		$60,3^a \pm 1,2$	$32,9^a \pm 0,5$
CC	5 °C		$60,3^a \pm 0,4$	$32,9^a \pm 0,9$
	TA		$60,4^a \pm 0,5$	$32,7^a \pm 0,2$
SC	5 °C	1 dia	$60,9^a \pm 0,5$	$33,9^a \pm 0,4$
	TA		$60,0^a \pm 0,8$	$32,9^a \pm 0,5$
CC	5 °C		$59,8^a \pm 2,9$	$32,5^a \pm 1,3$
	TA		$62,7^a \pm 0,7$	$34,5^a \pm 1,4$
SC	5 °C	3 dias	$60,8^a \pm 0,3$	$33,2^a \pm 0,3$
	TA		$61,7^a \pm 1,5$	$34,4^a \pm 0,6$
CC	5 °C		$59,6^a \pm 1,1$	$32,8^a \pm 1,0$
	TA		$61,6^a \pm 0,2$	$33,0^a \pm 0,4$

Numa coluna, letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (teste Tukey HSD).

A comparação estatística entre as médias das amostras para os parâmetros $^{\circ}$ h e WI não expressou, em todas as situações testadas, variações com significado estatístico ($p>0,05$), traduzindo a ausência dos efeitos corte e temperatura de armazenamento, na alteração da cor dos subprodutos ao longo dos 3 dias de armazenamento.

O escurecimento dos subprodutos previsto, principalmente nas situações das amostras submetidas ao corte e armazenadas à temperatura ambiente não foi observado. Esta alteração esperada baseava-se na oxidação enzimática dos substratos fenólicos sob acção das oxirredutases, nomeadamente da polifenoloxidase (PPO) e da peroxidase (POD) que é mais provável de ocorrer nas células cortadas onde se verifica a mistura de enzimas e substratos e, à temperatura ambiente por ser favorável para a actividade enzimática.

6.2.2 pH e Teor sólidos totais

Os efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0, 1 e 3 dias) nos valores médios de pH e TSS (\pm DP) de amostras de subprodutos de cenoura é apresentado na Figura 17 e 18 (Tabela 11, em anexo).

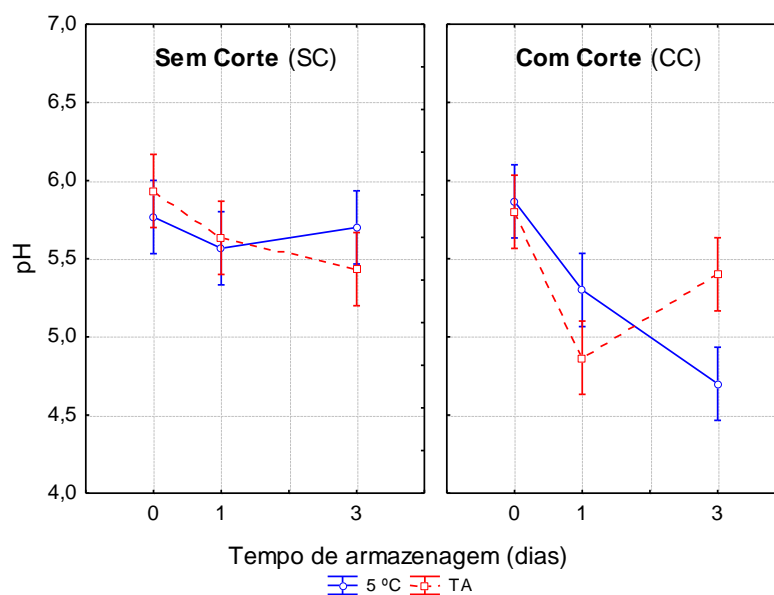


Figura 17 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0, 1 e 3 dias) nos valores médios de pH de amostras de subprodutos de cenoura. As barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

O valor de pH inicial dos subprodutos, de carácter ácido, foi de $5,9 \pm 0,3$ e a variação máxima registada entre amostras foi de 1,2 unidades.

Os efeitos do corte e do tempo de armazenamento revelaram-se significativos ($p < 0,05$) para as variações de pH das amostras de subprodutos de cenoura, promovendo a respectiva diminuição.

Da Figura 17 é possível observar que nas amostras com corte a descida dos valores de pH é significativa ($p < 0,05$) no primeiro intervalo testado, independentemente da temperatura de armazenamento. No período subsequente a variação do pH só foi significativa nas amostras mantidas à temperatura de 5 °C. Nas amostras sem corte verifica-se a estabilidade dos valores de pH, independentemente da temperatura e tempo de armazenamento ($p > 0,05$).

A tendência de diminuição dos valores de pH nas amostras cortadas poderá ser justificada pela maior disponibilidade de substratos promovida nesta situação com o consequente desenvolvimento de bactérias lácticas e respectiva acidificação (Kakiomenou *et al.*, 1996).

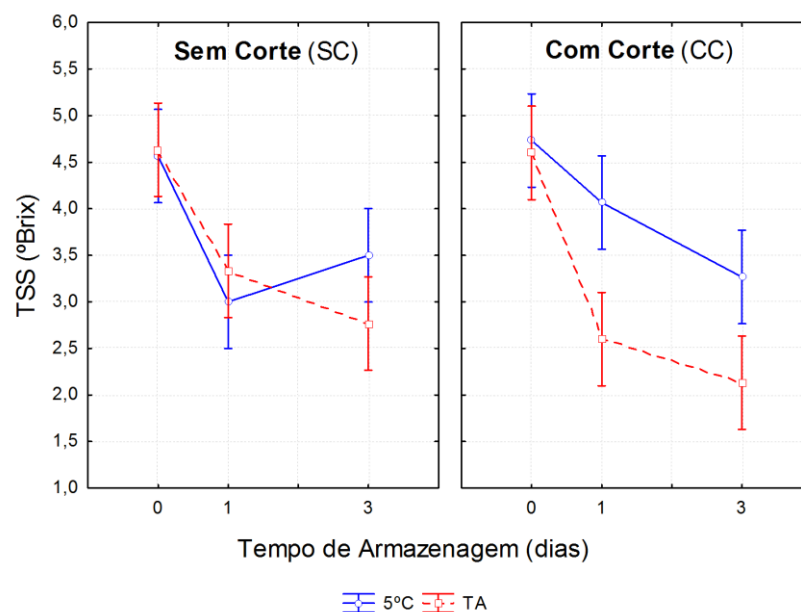


Figura 18 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0, 1 e 3 dias) nos valores médios de TSS de amostras de subprodutos de cenoura. As barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

Pela observação da Figura 18, apenas os efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento se revelaram significativos ($p < 0,05$) nas variações do teor de sólidos solúveis (TSS) das amostras de subprodutos de cenoura, tendo-se, de uma forma geral, verificado uma tendência de diminuição ao longo da armazenagem, a partir dos valores iniciais, de cerca de 5 °Brix. Esta diminuição poderá ser atribuída ao desenvolvimento microbológico nas amostras e respectivo consumo dos açúcares.

É possível observar (Figura 18) que nas amostras sem corte (SC) a diminuição significativa ($p < 0,05$) dos valores de TSS (de cerca de 1 °Brix) ocorreu no 1º intervalo testado, mantendo-se sem variações ($p > 0,05$) até ao 3º dia, independentemente da temperatura de armazenagem. Para as amostras trituradas (CC) a descida do TSS foi distinta em função da temperatura de armazenagem, sendo mais acentuada à temperatura ambiente do que a 5 °C (2,5 °Brix face 1,5 °Brix), respectivamente.

6.2.3 Teor fenólico total

Na Figura 19 (Tabela 12, em anexo) são apresentados os valores médios do teor fenólico total das amostras de subprodutos de cenoura minimamente processada.

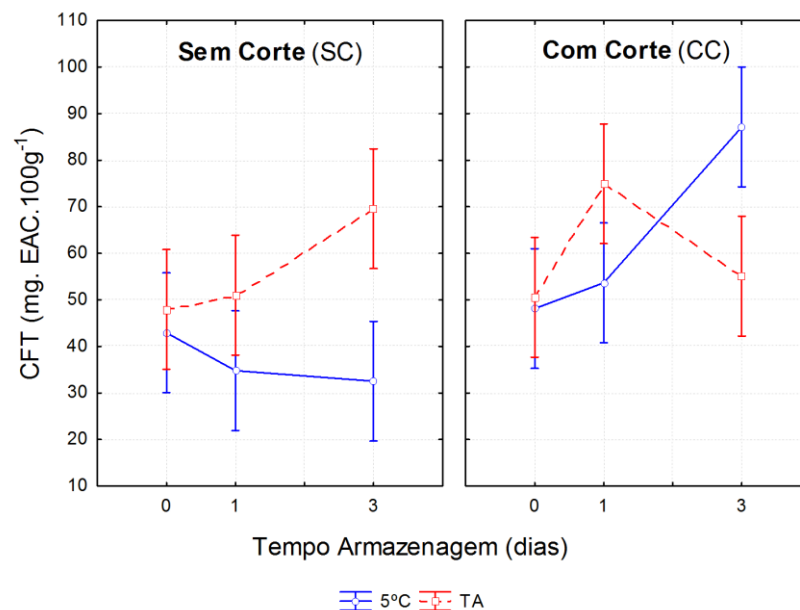


Figura 19 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0, 1 e 3 dias) nos valores médios de teor fenólico total (\pm DP) de amostras de subprodutos de cenoura. As barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

A variação do teor fenólico inicial dos subprodutos de $48,0 \pm 4,5$ mg EAC.100 g⁻¹ revelou uma tendência de aumento e de estabilidade durante o período de armazenamento em função dos factores em teste. Os aumentos traduzem o efeito de activação ao corte da fenilalanina-amonia-liase – PAL, enzima chave do metabolismo de fenólicos e consequente acréscimo destes compostos nos tecidos (Saltveit, 2000).

Da Figura 19 é possível observar que para os subprodutos não triturados (SC) ocorreu uma tendência de aumento não significativo ($p > 0,05$) do teor fenólico na condição de armazenamento à temperatura ambiente. Para o mesmo tipo de amostras mas armazenadas a 5 °C não se verificou alteração face aos teores iniciais.

Nas amostras trituradas (CC) verificaram-se tendências não significativas ($p > 0,05$), de aumento no 1º intervalo e de diminuição no 2º intervalo, testados, à temperatura ambiente. A justificação deste comportamento pode ser atribuída ao balanço entre a síntese e o consumo de fenólicos. Os compostos fenólicos induzidos pela PAL foram posteriormente oxidados nas reacções promovidas pela polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD) uma vez que nestas condições (corte e TA) estas enzimas encontram-se mais disponíveis nos tecidos cortados e ao valor de temperatura mais próximo do respectivo óptimo de actividade (Cantos *et al.*, 2002).

Na condição de refrigeração (5 °C), as amostras CC denotaram acréscimos sempre consistentes durante a armazenagem com valores significativamente superiores ($p < 0,05$) ao 3º dia, resultando num aumento de 1,8 vezes face aos teores iniciais. Em refrigeração (5 °C) a indução fenólica ao corte superou o consumo de fenólicos resultantes da actividade de oxirredutases (PPO e POD), provavelmente pelo efeito de inibição da respectiva actividade nestas condições de temperatura. Estes resultados são concordantes com os obtidos no estudo de Alegria *et al.* (2014) no qual se verificou a duplicação dos teores fenólicos iniciais em cenoura ripada ao longo da armazenagem à temperatura de 5 °C.

6.2.4 Contagens microbiológicas

Os resultados do desenvolvimento microbiano durante o período de armazenagem considerado das amostras em avaliação são apresentados na Figura 20 (Tabela 13, em anexo).

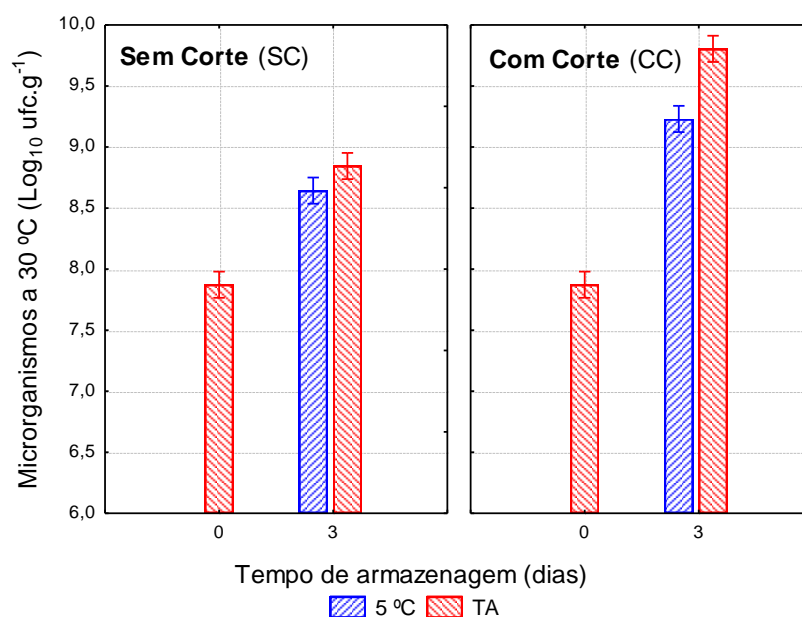


Figura 20 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenagem (0 e 3 dias) nas contagens médias de Microrganismos a 30 °C de amostras de subprodutos de cenoura. As barras verticais correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

A contaminação inicial dos subprodutos de cenoura verificou contagens de microrganismos mesófilos de $7,9 \pm 0,1 \text{ Log}_{10} \text{ ufc.g}^{-1}$. Este valor traduz uma contaminação elevada que se justifica pela proveniência do material descartado das linhas de fabrico.

O aumento da carga microbiológica foi expressivo ($p < 0,05$) (Figura 20) em todas as condições testadas. No entanto foi menor nas amostras sem corte (não excedendo 1 ciclo Log) do que nas amostras cortadas (não excedendo 2 ciclos Log). O efeito do aumento da temperatura só apresentou significado ($p < 0,05$) nas amostras cortadas com registos máximos de cerca de 9,8 ciclos Log.

O maior desenvolvimento microbiológico nestas amostras pode ser atribuído ao incremento de substratos intracelulares libertados após o corte. Este resultado correlaciona-se com a acidificação das amostras verificada no mesmo período de armazenamento, com excepção do valor de pH na amostra com corte à temperatura ambiente.

Tendo em conta que para o teor de sólidos solúveis contribuem um conjunto de substâncias cuja predominância neste tipo de materiais são açúcares solúveis e que o valor característico atribuído à cenoura é de 6 °Brix (Alves *et al.*, 2010), esta tendência de diminuição dos valores de TSS nas amostras pode ser justificada pelo facto das potenciais bactérias lácticas utilizarem o açúcar existente nas amostras para o seu desenvolvimento.

6.3 Balanço intercalar

O mecanismo de indução fenólica pelo corte – introdução da operação de trituração, revelou-se importante para o acréscimo dos teores destes compostos nos tecidos de cenoura, ao final de 3 dias em condições de refrigeração (5 °C). Para além disso em condições de refrigeração o retardamento do desenvolvimento microbiano é igualmente importante para prevenir fenómenos de fermentação rápida e consequentes alterações da composição dos subprodutos.

A introdução desta operação, prévia à fase de extracção propriamente dita, poderá ser importante para aumentar o rendimento de recuperação destes compostos uma vez que nos processos de extracção verificam-se perdas.

7. Optimização das Condições de Extracção de Compostos Fenólicos a Partir de Subprodutos de Cenoura

Na persecução dos objectivos propostos nesta fase pretende-se avaliar processos eficientes para a extracção de compostos fenólicos de subprodutos de cenoura submetidos ao stress abiótico nas condições identificadas em 6.3.

Atendendo a que se pretende produzir extractos para incorporação em alimentos, optou-se por usar como solvente a água. Foi testada a extracção aquosa a quente e à temperatura ambiente assistida por ultra-sons.

7.1 Delineamento experimental

A optimização da extracção foi testada através do Delineamento Central Composto Rotacional considerando duas variáveis independentes – tempo (t) e razão H₂O:SPC (R) cujos intervalos de variação foram, t - 0 a 60 minutos e R - 2:1 a 12:1 partes de água em relação a amostra.

O delineamento experimental envolveu quatro etapas: selecção das variáveis independentes e respectivos níveis; formulação do delineamento central composto rotacional – DCCR; construção do modelo; e encontrar as soluções óptimas na situação em que o modelo apresentou validade estatística.

O delineamento experimental incluiu duas variáveis independentes ($n = 2$). O ensaio definido por estes pontos compreendeu: 2 n pontos para um modelo factorial completo (n_q = pontos quadráticos) (níveis + 1 e - 1), 2 n pontos axiais (n_e = pontos estrela), codificados com $+\alpha$ e $-\alpha$. O valor de α deriva do número de pontos do modelo factorial (F)

e do número de variáveis (n), sendo calculado pela equação $\alpha = \sqrt{n_q}$, onde n_q = nº de pontos quadráticos, resultando $+\alpha = 1,41$ e $-\alpha = -1,41$, para as 2 variáveis. Tendo ainda de 3 a 4 repetições no ponto central (n_0 = pontos centrais). O ponto central fornece uma média para estimar o erro experimental e a falta de ajuste e, os pontos axiais são adicionados para estimar a curvatura do modelo.

As condições testadas são representadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Matriz codificada e decodificada para optimização das condições de extracção.

Ensaio	Codificada		Decodificada	
	Tempo (min.)	H ₂ O:SPC	Tempo (min.)	H ₂ O:SPC
1	-1	1	9	10,5:1
2	0	0	30	7:1
3	-1	-1	9	3,5:1
4	0	- α	30	2:1
5	α	0	60	7:1
6	- α	0	0	7:1
7	0	0	30	7:1
8	0	α	30	12:1
9	1	-1	51	2:1
10	0	0	30	7:1
11	0	0	30	7:1
12	1	1	51	10,5:1

O delineamento considerado incluiu 12 ensaios independentes, com 4 pontos relativos ao planeamento factorial completo ($n_q = 1,3,9$ e 12), 4 pontos estrela (α) ($n_e = 4,5,6$ e 8) e 4 repetições do ponto central ($n_0 = 2,7,10$ e 11) conforme apresentado na Tabela 6 (níveis codificados e decodificados).

Na extracção a quente a temperatura foi mantida constante à temperatura de ebulição. Os ensaios de sonicação em água foram efectuados a 35 kHz.min⁻¹.

O atributo em avaliação (variável dependente) compreendeu a determinação de compostos fenólicos, por método expedito.

7.2 Procedimento experimental

Na Figura 21 apresenta-se o esquema de trabalho seguido nas diferentes extracções consideradas no delineamento experimental.

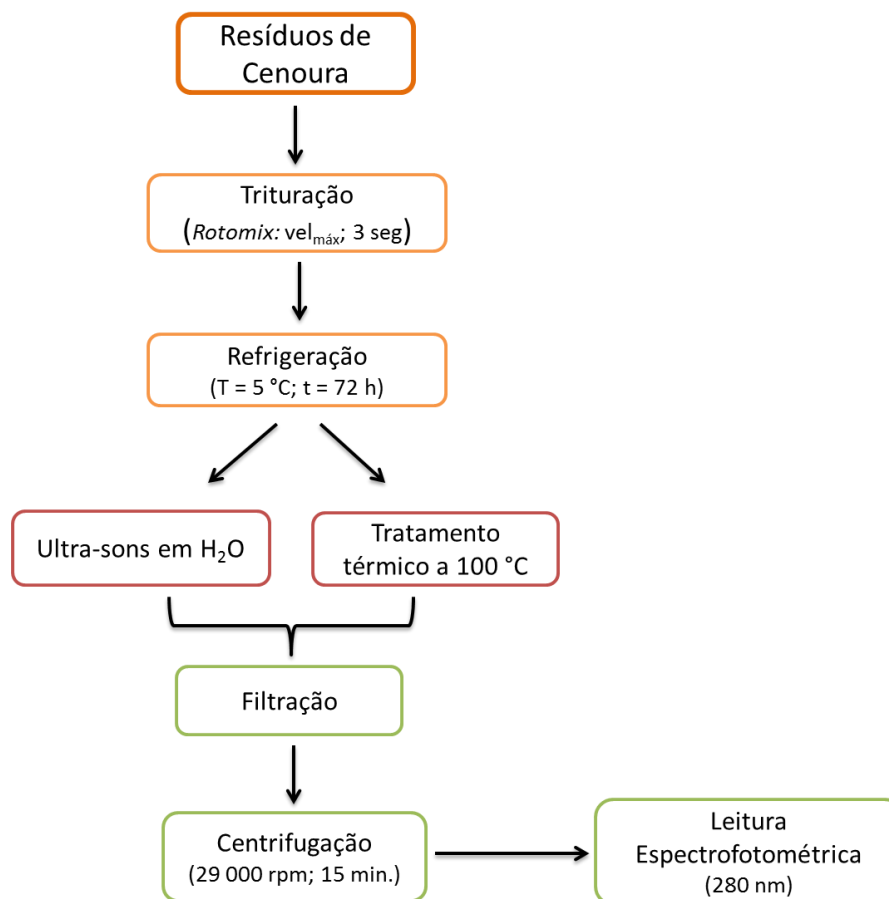


Figura 21 - Diagrama do processo de execução.

Os subprodutos de cenoura após a recepção no laboratório foram triturados e sujeitos a condições de refrigeração durante 72 horas (cf. 6.3). Amostras homogêneas de 20 g foram constituídas a partir do material anterior e congeladas a -80 °C.

As amostras sujeitas ao tratamento com ultra-sons foram colocadas em balões de *erlenmeyer* na proporção (H₂O:SPC) definida pela matriz e extractadas durante os intervalos de tempos correspondentes. Os balões foram colocados no banho de ultra-sons (Elma D-78224) com uma frequência constante de 35 kHz.min⁻¹. Posteriormente a amostra obtida foi filtrada para um balão volumétrico (250 mL), perfazendo o volume total de 250 mL com água destilada. As soluções foram em seguida centrifugadas (HERMLE Z383K) durante 15 min a uma velocidade de 29 000 rpm. Por fim utilizou-se o sobrenadante obtido para realizar a leitura da absorvância a 280 nm (GBC UV/VIS 916). Foram efectuados triplicados.

No caso do processo com tratamento térmico, amostras de 20 g de subproduto foram colocadas num aparelho de *clevenger* por forma a evitar alterações do volume de solvente e extractadas nas condições definidas pelo delineamento experimental. As etapas subsequentes são as descritas para tratamento com ultra-sons.

7.3 Tratamentos dos resultados

Metodologia de Superfícies de Resposta (RSM)

Os resultados obtidos no estudo de optimização das condições de extracção foram tratados pelo Método de Superfície de Respostas (RSM) com utilização do modelo empírico de regressão polinomial quadrática (Eq. 9) para estimar as respostas individuais. A análise de regressão múltipla é uma extensão da regressão linear simples, que permite que muitas variáveis independentes sejam incluídas na equação de regressão para o elemento “Y”.

Para cada resposta em estudo (variável dependente Y), os respectivos resultados experimentais foram ajustados a equações polinomiais de segunda ordem (Eq. 9) e submetidos à análise de regressão multivariada (ANOVA) para avaliar a qualidade dos modelos.

(Eq. 9)	$Y = b_0 + b_1t + b_{11}t^2 + b_2R + b_{22}Rt^2 + b_{12}tR$	b_n : coeficientes de regressão t; R : variáveis independentes, temperatura e razão de H ₂ O: SPC, respectivamente
---------	---	--

Na avaliação da significância e validade dos modelos foram tidos em conta os coeficientes de regressão múltipla (r^2 e r^2_{ajust}). Na avaliação destes coeficientes (r^2 e r^2_{ajuste}) utilizou-se o critério em que a diferença entre ambos deverá distar menos de uma décima de unidade (Montgomery, 1997).

7.4 Resultados e discussão

Os resultados da avaliação dos compostos fenólicos, expressos em mg de eq. ácido gálico.g⁻¹, em função das variáveis independentes em estudo (t, R) foram ajustados ao modelo polinomial quadrático de 2ª ordem, cujos coeficientes de regressão atribuídos às variáveis independentes e respectivas interacções estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Coeficientes de regressão e respectivas probabilidades do modelo quadrático para compostos fenólicos.

Factor	Ultra-sons		Tratamento térmico	
	CF ⁽¹⁾ ($r^2=0,86$; $r^2_{ajust}=0,74$)		CF ($r^2=0,94$; $r^2_{ajust}=0,87$)	
	Coeficiente	p ⁽²⁾	Coeficiente	p
Intersecção	22,1545	0,3493	18,7401	0,0321
t	2,2323	0,0176	0,7894	0,0116
t ²	-0,0211	0,0445	-0,0048	0,1101
R	4,7269	0,3534	3,6775	0,0460
R ²	-0,0727	0,8050	-0,1242	0,2019
tR	-0,0333	0,5987	-0,0254	0,1945

CF⁽¹⁾ – Compostos fenólicos; p⁽²⁾ – probabilidade.

O modelo que expressa a extracção de compostos fenólicos (mg EAG.g⁻¹) em solução aquosa assistida por ultra-sons, representado na Figura 22, apresentou um ajuste adequado expresso pelos coeficientes de variância (Tabela 7) próximos da unidade ($r^2=0,86$; $r^2_{ajust}=0,74$).

Para os coeficientes de regressão (Tabela 7) obtidos com este tratamento, verifica-se que a variação dos tempos de extracção (efeito linear e quadrático) foram significativos ($p<0,05$), para as respostas geradas pelo modelo. Assim, constata-se que as alterações significativas no teor de compostos fenólicos, descritas através do respectivo modelo (Eq. 10) resultaram maioritariamente da variação dos tempos de extracção. O efeito da razão solvente:soluto não apresenta significado estatístico.

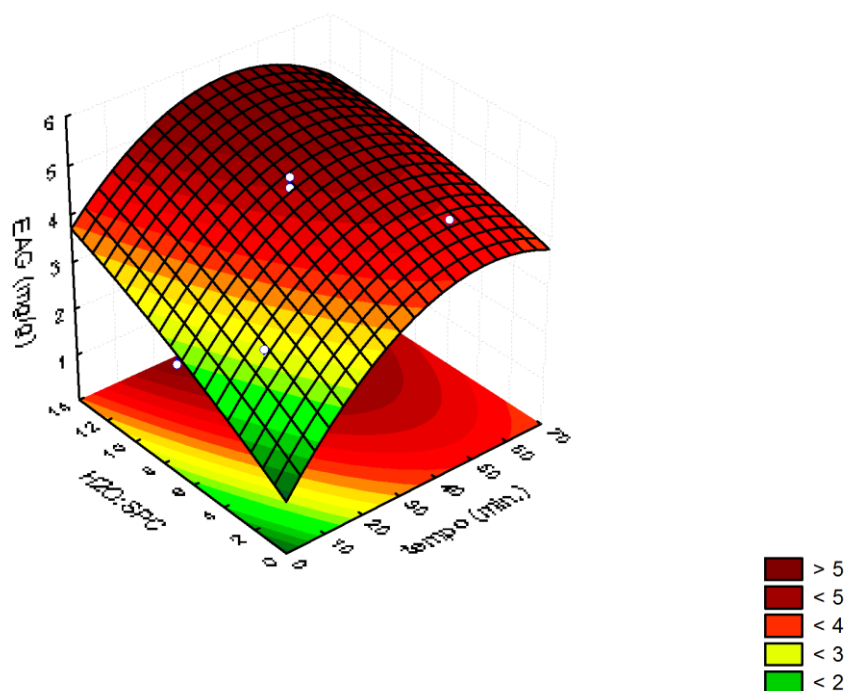


Figura 22 - Superfície de resposta para o teor de CFT (projecção no ponto central) em função da relação solvente:soluto e do tempo de extracção assistida por ultra-sons.

$$EAG = 22,15 + 2,23t - 0,21t^2 + 4,73R - 0,07R^2 - 0,03tR \quad (\text{Eq.10})$$

A superfície de resposta que traduz a equação 10 permite observar que o teor de ácido gálico na amostra em função do tempo e razão H₂O:SPC é muito influenciado pelo tempo de extracção, atingindo valores maiores a partir de 30 minutos. O efeito de R, apesar de não ser significativo, evidencia ligeiros acréscimos com o aumento da variável independente, correspondendo a condições mais favoráveis a $R \geq 10:1$.

O modelo que expressa a extracção de compostos fenólicos (mg EAG.g⁻¹) em solução aquosa à temperatura de ebulição, constante da Figura 23, apresentou, igualmente, um ajuste adequado expresso pelos coeficientes de variância (Tabela 7) próximos da unidade ($r^2=0,94$; $r^2_{\text{ajust}}=0,87$) e diferença entre eles, inferior a uma décima.

A variação dos tempos de extracção contribuíram significativamente ($p<0,05$) para as respostas geradas pelo modelo dos efeitos lineares das duas variáveis em estudo, sendo o efeito da razão solvente:soluto superior.

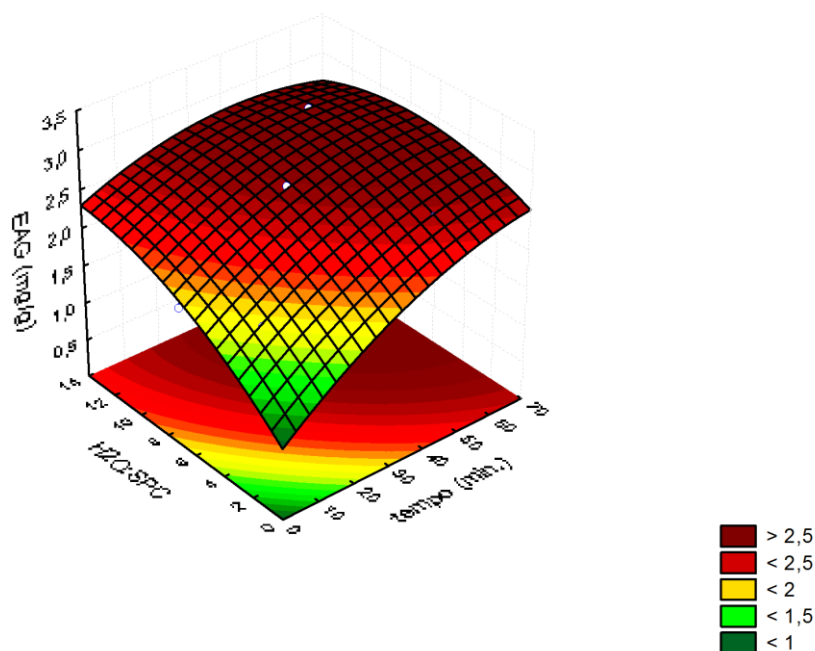


Figura 23 - Superfície de resposta para o teor de CFT (projecção no ponto central) em função da relação solvente:soluto e do tempo de extracção com aplicação do tratamento térmico a 100 °C.

$$EAG = 18,74 + 0,79t - 0,005t^2 + 3,68R - 0,12R^2 - 0,03tR \quad (\text{Eq. 11})$$

Pela observação da Figura 23 verifica-se que a alteração do teor de ácido gálico na amostra aumenta com os acréscimos do tempo e da razão H₂O:SPC. O rendimento de extracção mais elevado corresponde à região escura (> 2,5) delimitada para valores de tempo ≥ 37 min e razão H₂O:SPC > 4:1.

Face aos resultados obtidos verifica-se que a extracção aquosa assistida por ultra-sons se afigura mais vantajosa na extracção de fenólicos do que a extracção à temperatura de ebulição.

Este fenómeno pode ser explicado pela facto dos ultra-sons promoverem a ocorrência de danos nas paredes e membranas celulares, permitindo uma melhor penetração do solvente (água), favorecendo assim a extracção dos compostos fenólicos (Novac *et al.*, 2008). Por outro lado os compostos fenólicos são mais sensíveis à perda durante o processamento, nomeadamente tratamentos pelo calor (Campos *et al.*, 2008).

Assim, na extracção aquosa assistida por ultra-sons, a melhor combinação das variáveis independentes em estudo demonstrou tempos de 30 minutos e razão de 10:1, mas dado que o extracto obtido será posteriormente desidratado, procedeu-se à

extracções que produzem igualmente bons rendimentos, mas com incorporação de menos água. A condição seleccionada é tempo de extracção de 50 minutos e razão 4:1.

7.5 Balanço intercalar

Extracção aquosa na razão de 4:1 assistida por ultra-sons durante 50 min é a condição optimizada para a extracção de compostos fenólicos, com rendimento de 4,6 mg EAG.g⁻¹ de subproduto de cenoura.

8. Obtenção de Extracto Fenólico e Subprodutos de Cenoura Desidratados

Com o objectivo de obter extractos fenólicos em quantidade adequada a posteriores utilizações, foram efectuadas extracções em maior escala e nas condições previamente optimizadas.

8.1 Procedimento

A partir de 5 kg de subprodutos de cenoura previamente submetidos ao stress abiótico (cf. 6.3) foram constituídas amostras homogéneas de 200 g e congeladas a -80 °C. Posteriormente amostras de 200 g de subproduto foram adicionadas de 800 mL de H₂O destilada e sujeitas a extracção com ultra-sons (Elma D-78224) durante 50 min a uma frequência constante de 35 kHz.min⁻¹. Tal como descrito em 7.2 procedeu-se a uma filtração para separar os resíduos sólidos do extracto líquido e por fim, à centrifugação (29 000 rpm; 15 min) (HERMLE Z383K) para obtenção do sobrenadante límpido.

Seguiu-se o processo de secagem das soluções sobrenadantes por liofilização (Telstar LyoQuest) (amostra A). Paralelamente procedeu-se à liofilização de amostras de subprodutos de cenoura sujeitos ao stress abiótico (cf. 6.3) (Amostra B). Extractos e subprodutos liofilizados foram devidamente acondicionados ao abrigo da luz e mantidas em exsiccador até posterior utilização.

8.2 Caracterização dos extractos fenólicos e do subproduto liofilizados

Com a presente caracterização pretendeu-se avaliar a actividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos das amostras.

Para esta avaliação foram efectuadas as extracções metanólicas das amostras. Foram pesados 0,25 g de extracto e 0,5 g de subproduto liofilizado que foram diluídas em 10 mL de metanol. Posteriormente foram sujeitas a condições de refrigeração (5 °C) *overnight*.

Os extractos obtidos foram utilizados para a determinação da actividade antioxidante pelo método de captação do radical livre DPPH e redução do ião férrico (FRAP) e para a determinação dos compostos fenólicos pelo método *Folin-Ciocalteu* (cf. 4.2.6 e 4.2.10).

8.3 Resultados e Discussão

8.3.1 Rendimento

Os produtos obtidos podem ser observados na Figura 24.



Figura 24 – Extracto aquoso e subproduto de cenoura liofilizados.

Após o processo de liofilização do extracto aquoso o rendimento obtido foi de 2 % (m/m), por outro lado, no caso dos subprodutos de cenoura obteve-se um rendimento de 12,5 % (m/m). Estes valores estão de acordo com o esperado atendendo ao elevado teor de humidade destes produtos, cerca de 90 %.

8.3.2 Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos

Na Tabela 8 que se segue encontram-se os resultados relativos a capacidade antioxidante e ao teor em compostos fenólicos presente nas duas amostras em análise, extracto e subproduto de cenoura, respectivamente.

Tabela 8 - Capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos nas amostras em estudo.

Amostra	Inibição do DPPH• ($\mu\text{M Trolox} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Poder Redutor (FRAP) ($\mu\text{mol SF} \cdot \text{g}^{-1}$)	Compostos Fenólicos ($\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$)
Extracto	$4,2^a \pm 0,8$	$1,8^a \pm 0,5$	$1^a \pm 0,07$
Subproduto	$1,9^b \pm 0,5$	$1^b \pm 0,1$	$0,019^b \pm 0,01$

Numa coluna, letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (teste Tukey HSD).

Quanto à determinação da actividade antioxidante nas duas amostras, foram utilizados dois métodos. Pelo método DPPH, o resultado foi expresso em *TEAC* (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) e no FRAP em μmol de sulfato ferroso. Como era expectável, o extracto foi aquele que apresentou maior capacidade antioxidante - $4,18 \mu\text{M}$

Trolox. μL^{-1} e $1,82 \mu\text{mol}$ de sulfato ferroso. g^{-1} em relação aos resíduos de cenoura que revelaram $1,91 \mu\text{M}$ Trolox. μL^{-1} e $1,05 \mu\text{mol}$ de sulfato ferroso. g^{-1} .

O teor em compostos fenólicos nas amostras em estudo foi expresso em mg de eq. ácido gálico. g^{-1} . Os valores obtidos para o extracto (Amostra A) foram de $1,0 \pm 0,7 \text{ mg EAG.g}^{-1}$ de extracto e para os resíduos de cenoura (Amostra B) foram de $0,019 \pm 0,01 \text{ mg EAG.g}^{-1}$ de resíduo de cenoura. Segundo Zhang e Hamauza (2004) o teor de compostos fenólicos na casca e no floema da cenoura varia entre 4,96 e 6,26 mg EAG. g^{-1} matéria seca e 0,75 e 1,55 mg EAG. g^{-1} matéria seca, respectivamente, conforme a variedade da cenoura. Por outro lado, Kähkönen *et al.* (1999) obtiveram valores de 6,6 e 0,6 mg EAG. g^{-1} matéria seca para a casca e floema, respectivamente.

A diferença observada entre os valores dos estudos já realizados e os obtidos experimentalmente no presente trabalho pode ser justificada pela natureza do material, uma vez que as amostras resultaram de produto muito heterogéneo e não partes separadas e analisadas individualmente. O método de extracção utilizado, assim como maneiras diferentes de expressar os resultados também contribuem para a diferença dos valores observados (Zhang e Hamauza, 2004).

8.4 Balanço intercalar

O extracto (Amostra A) revelou maior actividade antioxidante e maior teor de compostos fenólicos do que os resíduos de cenoura desidratados (Amostra B), mas mesmo assim os valores obtidos não revelam teores significativos em termos teóricos. Este desfasamento entre os valores dos estudos já realizados e os obtidos justifica-se pela elevada heterogeneidade do material utilizado.

9. Incorporação dos Resíduos de Cenoura e do Respectivo Extracto Aquoso Liofilizado em Pão

Nesta fase procedeu-se a incorporação do extracto e dos resíduos de cenoura obtidos num produto alimentar – pão, tendo como objectivo avaliar o grau de melhoria resultante, quer do ponto de vista bioactivo quer sensorial.

9.1 Procedimento

Foram adicionados 20,5 mg do extracto e 20 g de subproduto de cenoura liofilizado à receita do pão de modo a que o teor em compostos fenólicos fosse equivalente no produto final obtido.

Para a elaboração do pão utilizou-se a seguinte receita:

- 330 g de água
- 1 colher de chá de sal
- 25 g de fermento fresco
- 500 g farinha

Foram produzidos três tipos deste pão, sendo um simples, um com incorporação dos subprodutos de cenoura liofilizada e um com incorporação de extracto (Figura 25).



Figura 25 - Pão saloio após cozedura: 1 - com extracto; 2 – simples; 3 – com subproduto.

Posteriormente este pão foi utilizado nas determinações analíticas, para os quais apenas se recorreu a utilização do miolo de cada um.

9.2 Determinações analíticas

9.2.1 Actividade antioxidante e teor de compostos fenólicos

A actividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos em cada uma das três amostras (amostra A – pão com extracto; amostra B – pão com subproduto de cenoura; amostra C – pão simples) foram determinados de acordo com processos anteriores (cf. 4.2.6 e 4.2.10). Foram preparados os extractos metanólicos das amostras: 10 g de cada amostra foram suspensas em 20 mL de metanol. Posteriormente foram sujeitas a condições de refrigeração (5 °C) *overnight*.

Também foi determinado o teor de humidade do pão, para poder reportar os dados a matéria seca.

9.2.2 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada na sala de provas no DCEB (Departamento de Ciências e Engenharia de Biosistemas) no edifício Ferreira Lapa, no Instituto Superior de Agronomia.

Para a realização da análise sensorial aos três tipo de pão, foi necessário preparar as respectivas amostras. Estas resultaram do miolo de cada um dos produtos (Figura 26), sendo cada uma delas codificada com um código de três dígitos. Foram criados três códigos diferentes para cada amostra, de modo a evitar influências alheias que pudessem influenciar a decisão dos provadores.



Figura 26 - Amostras para análise sensorial: 1 – miolo de pão simples; 2 – miolo de pão com subproduto; 3 – miolo de pão com extracto.

Na execução desta prova, participaram 30 provadores (painel não treinado) de ambos os sexos, com idades compreendidas entre 20 e 54 anos, aos quais foi apresentado

um conjunto de 3 amostras (Figura 27) sendo-lhes pedido que as ordenassem de acordo com a sua preferência. As amostras foram apresentadas simultaneamente.

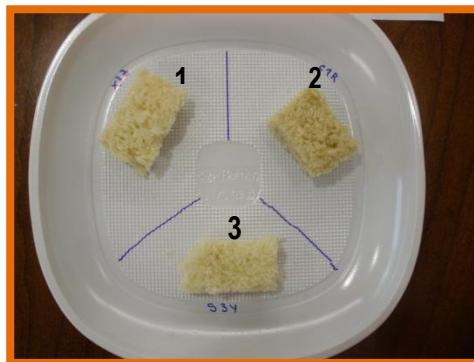


Figura 27 - Amostras de pão: 1 – simples; 2 - com subproduto de cenoura; 3 - com extracto.

Nos testes de preferência os provadores são instruídos a dar ordem 1 à amostra preferida, ordem 2 à que preferem em segundo lugar e assim sucessivamente.

O tratamento dos resultados foi efectuado recorrendo a utilização do *Microsoft Office Excel* 2010, seguindo as indicações da Norma ISO 8587:1988.

Para poder comparar duas amostras individuais utilizou-se a equação 12:

$$|R_i - R_j| \geq 1,96 \sqrt{\frac{N \times k \times (k+1)}{6}} \quad \text{Eq. 12}$$

Onde:

- R_i e R_j – representa a soma das ordens das amostras i e j (1,2,...,k)
- N – representa o nº de provadores
- K – representa o nº de amostras

9.3 Resultados e Discussão

9.3.1 Actividade antioxidante e teor de compostos fenólicos

Na Tabela 9 pode-se observar os dados relativos a capacidade antioxidante e do teor de compostos fenólicos em cada uma das 3 amostras analisadas.

Tabela 9 - Valores da capacidade antioxidante e do teor de compostos fenólicos nas 3 amostras em estudo.

Amostra	Inibição do DPPH• ($\mu\text{M Trolox} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Poder Redutor (FRAP) ($\mu\text{mol SF} \cdot \text{g}^{-1}$)	Compostos Fenólicos ($\text{mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$)
Pão com extracto	$0,11^a \pm 0,101$	$0,59^a \pm 0,05$	$0,003^a \pm 0,003$
Pão com spcenoura	$0,41^b \pm 0,077$	$0,73^a \pm 0,008$	$0,018^b \pm 0,006$
Pão simples	$0,08^a \pm 0,004$	$0,74^a \pm 0,16$	—

Numa coluna, letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (teste Tukey HSD).

Segundo estes resultados é possível observar que o pão com a incorporação do extracto e o pão simples não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$) no que diz respeito a actividade antioxidante determinada pela captação do radical livre DPPH. Já o pão com a incorporação de subprodutos de cenoura revelou uma capacidade antioxidante ligeiramente superior, $0,41 \pm 0,077 \mu\text{M Trolox} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Em contrapartida, a capacidade antioxidante determinada pelo método FRAP não revelou diferenças significativas ($p>0,05$) entre as 3 amostras analisadas.

Em termos do teor de compostos fenólicos, no pão simples não se registou a presença destes compostos e no pão com a incorporação do extracto, a presença é residual, $0,003 \pm 0,003 \text{ mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$ de matéria seca. O pão com a incorporação de subprodutos de cenoura foi aquele que demonstrou maior teor em compostos fenólicos, $0,018 \pm 0,006 \text{ mg EAG} \cdot \text{g}^{-1}$ de matéria seca.

Segundo estes dados, não compensa proceder a incorporação do extracto em alimentos que serão sujeito a um tratamento térmico, pois a temperatura afecta a estabilidade da componente bioactiva. No caso da incorporação dos resíduos de cenoura, a componente bioactiva foi igualmente afectada, no entanto esta foi ligeiramente inferior, uma vez que a matriz do material vegetal protegeu parcialmente a amostra do tratamento térmico aplicado.

Face aos resultados é importante proteger tanto o extracto como a matéria vegetal antes da sua incorporação em qualquer género alimentício que seja sujeito a um tratamento térmico a elevadas temperaturas. O encapsulamento poderá ser a forma mais expedita de proceder à referida protecção.

9.3.2 Análise sensorial

Recorrendo a utilização do método de comparação de duas amostras individuais, a um nível de significância de 5 % (Eq. 12) é possível observar que não se registaram diferenças significativas entre as amostras (Tabela 10). Com estes resultados conclui-se que o pão pode ser enriquecido pela incorporação de extracto ou subprodutos de cenoura sem se verificar alterações sensoriais do mesmo.

Tabela 10 - Diferença nas somas das ordens observadas entre as 3 amostras (A – pão simples; B – pão com subprodutos; C – pão com extracto).

Amostras	Diferença	Conclusão
A B	$ 67-58 = 9 < 15,2$	Não há diferença significativa
A C	$ 67-55 = 12 < 15,2$	Não há diferença significativa
B C	$ 58-55 = 3 < 15,2$	Não há diferença significativa

9.4 Balanço Intercalar

Pode-se concluir que quando as temperaturas de tratamento são elevadas, não é viável incorporar nem o extracto nem o resíduo de cenoura em matrizes alimentares sem um prévio encapsulamento, uma vez que as perdas da componente bioactiva são muito elevadas.

10. Conclusões Gerais e Linhas de Investigação Futura

10.1 Conclusões Gerais

Face aos resultados obtidos no presente estudo, os subprodutos de cenoura provenientes de uma empresa de hortofrutícolas de minimamente processados apresentaram um bom potencial para a recuperação de compostos bioactivos.

De acordo com a caracterização dos subprodutos, os quantitativos em fenólicos totais e em carotenóides perspectivam a utilização deste subproduto para a recuperação de compostos antioxidantes, hidrofílicos (fenólicos) - $46,4 \pm 2,9$ mg EAC.100 g⁻¹ e lipofílicos (carotenóides) - $11,8 \pm 0,2$ mg eq. β -caroteno.100 g⁻¹, cujos componentes maioritários são o ácido clorogénico - $2,88 \pm 0,11$ mg.100 g⁻¹ e β -caroteno - $7,86 \pm 0,45$ mg.100 g⁻¹, respectivamente.

Com aplicação do stress abiótico – corte, ocorreram acréscimos de compostos fenólicos ao fim de 3 dias em condições de refrigeração (5 °C), sendo o valor inicial de $48,1 \pm 3,8$ mg EAC.100 g⁻¹ e ao fim do intervalo considerado de $87,2 \pm 9,7$ mg EAC.100 g⁻¹, o que corresponde a um aumento de 81 %. Para além disso em condições de refrigeração o retardamento do desenvolvimento microbiano é igualmente importante para prevenir fenómenos de fermentação rápida e consequentes alterações da composição dos subprodutos.

A hidroextração (razão 4:1 durante 50 min) assistida por ultra-sons foi a condição que permitiu obter maior rendimento de extracção de compostos fenólicos - 4,6 mg EAG.g⁻¹ amostra.

O extracto aquoso liofilizado apresentou maior actividade antioxidante - $4,2 \pm 0,8$ μ M Trolox. μ L⁻¹ e $1,8 \pm 0,5$ μ mol SF.g⁻¹ e maior teor em compostos fenólicos - $1,0 \pm 0,07$ mg EAG.g⁻¹ do que os subprodutos de cenoura liofilizados - $1,9 \pm 0,5$ μ M Trolox. μ L⁻¹ e $1,0 \pm 0,1$ μ mol SF.g⁻¹ e $0,02 \pm 0,01$ mg EAG.g⁻¹, respectivamente.

No que diz respeito a incorporação do extracto e subprodutos de cenoura numa matriz alimentar – pão, concluiu-se que com a aplicação de elevadas temperaturas de tratamento, ocorreram perdas significativas da componente bioactiva tornando esta operação imprópria para o efeito pretendido. Em termos da actividade antioxidante pelo método de captação do radical livre DPPH a perda com a incorporação do extracto foi de 97 % (m/m) e com a incorporação de subprodutos de cenoura foi de 79 % (m/m). No teor em compostos fenólicos houve uma perda quase total - 99,7 % (m/m), com a incorporação do

extracto, por outro lado, com a incorporação dos subprodutos liofilizados a perda foi de 57 % (m/m).

Em termos sensoriais, a incorporação do extracto ou subproduto liofilizado em pão não implicou diferenças significativas.

10.2 Linhas de Investigação Futura

Como propostas futuras de investigação propõe-se as seguintes questões:

Avaliar outras técnicas de extracção dos compostos bioactivos de subprodutos de cenoura, nomeadamente testar meios que permitam extrair também a componente não aquosa.

Testar formas de protecção dos elementos extraídos, mais concretamente técnicas de nano e micro encapsulamento.

Desenvolver produtos com incorporação de extracto que não envolva processamento térmico prolongado.

Desenvolver estratégias de conservação de subprodutos antes do processo extractivo.

11. Referências bibliográficas

- Aherne, S. A., O'Brien, N. M. (2002). *Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism*. Nutrition, v. 18, n. 1, pp. 75-81.
- Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C., & Shahidi, F. (2001). *Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, pp. 1410–1416.
- Alegria C., Elsa M. Gonçalves, Margarida Moldão-Martins, Marta Abreu, Luis Cisneros-Zevallos. (2012). *Wound-induced responses during low temperature storage of shredded carrot*. In: "Proceedings of the CeFood 2012: 6th Central European Congress on Food", Novi Sad, pp. 952-955.
- Alegria, C. (2014). *Heat shock and uv-c abiotic stress treatments as alternative tools to promote fresh-cut carrot quality and shelf-life*. Dissertação de Doutorado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa. pp. 261.
- Alegria, C., Gonçalves, E.M., Moldão-Martins, M., & Abreu, M. (2012). *Efeito do processamento mínimo no conteúdo fenólico de cenoura ripada (cv. Nantes) em refrigeração*. 11º Encontro de Química dos Alimentos, Bragança (Portugal).
- Alegria, C., Pinheiro, J., Duthoit, M., Gonçalves, E.M, Moldão-Martins, M., & Abreu, M. (2012). *Fresh-cut carrot (cv. Nantes) quality as affected by abiotic stress (heat shock and UV-C irradiation) pre-treatments*. LWT-Food Science and Technology, 48(2):197–203.
- Alves, S., Negreiros, M., Aroucha, E., Lopes, W., Teófilo, T., Freitas, F. e Nunes, G. (2010). *Qualidade de cenouras em diferentes densidades populacionais*. Revista Ceres 57(2): 218-223.
- Andreola K. (2013). *Microwave-assisted drying of carrot (Daucus carota L.)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química.
- Araújo, J. M. (2008). *Química de Alimentos: Teoria e Prática*. 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, pp. 477.
- Ayala-Zvala, J., Rosas-Domínguez, C., Veja-Veja, V. e González-Aguilar, G.A. (2010). *Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut fruits using their own byproducts: Cooking for integral exploitation*. Journal of Food Science. 75(8):175-181
- Azeredo, H.M. (2004). *Fundamentos de estabilidade de alimentos*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. pp. 195.

- Azizah, A. H., Ruslawatti, N. M., Tee, T. S. (1999). *Extraction and characterization of antioxidant from cocoa byproducts*. Food Chemistry, London, v. 64, n. 2, pp. 199-202.
- Baeta, M. (2014). *Subprodutos da indústria de hortofrutícolas minimamente processados: caracterização e valorização do potencial bioactivo e energético*. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa. pp. 100.
- Belkaid, A., Currie, J.C., Desgagnés, J., Annabi, B. (2006). *The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression*. Cancer Cell International. 6, 7:1–7:12.
- Bellizi, M. C., Franklin, M. F., Duthie, G. G., James, W. P. T. (1994). *Vitamin E and coronary heart disease: the European paradox*. Eur. J. Clin. Nutr, v. 48, n. 11, pp. 822-831.
- Betoret, E., Betoret, N., Vidal, D., Fito, P. (2011). *Functional foods development: Trends and technologies*. Food Science and Technology, 22: 498-508.
- Block, G. 1994. *Nutrient sources of provitamin A carotenoids in the American diet*. American Journal of Epidemiology 139:290-293.
- Blum, A., Monir, M., Wirsansky, I., Ben-Azir, S. (2005). *The beneficial effects of tomatoes*. European Journal of Internal Medicine, v. 1, n. 6, pp. 402- 404.
- Bolin, H.R., Huxsoll, C.C. (1991). *Control of minimally processed carrot (Daucus carota L.) surface discoloration caused by abrasion peeling*. Journal of Food Science. 56(2):416-418.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. Lebensmittel-Wissenschaft Technologie, London, v. 28, pp. 25-30.
- Britton, G. (1992). *Carotenoids*. In: HENDRY, G. F. (Ed.) *Natural foods colorants*. New York: Blackie. pp. 141-182.
- Campos, F.M., Martino, H.S., Sabarense, C.M. (2008). *Estabilidade de Compostos Antioxidantes em Hortaliças Processadas: uma revisão*. Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food and Nutrition. V.19, n.4, pp. 481 – 490.
- Cantos, E., Tudela, J.A., Gil, M.I., Espin, J.C. (2002). *Phenolic compounds and related enzymes are not rate-limiting in browning development of fresh cut potatoes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 3015-3023.
- Capecka, E., Mareczek, A., Leja, M. (2005). *Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species*. Food Chemistry, London, v. 93, pp. 223-226.

- Cartea, M. (2011). *Phenolic Compounds in Brassica Vegetables*. *Molecules*. 16(1): pp. 251-280.
- Cheryan, M. (1998). *Ultrafiltration and microfiltration handbook*. Lancaster: Technomic Publishing. pp. 526
- Chitarra, M. I. (1998). *Processamento mínimo de frutos e hortaliças*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. pp. 88
- Cisneros-Zevallos, L. (2003). *The Use of Controlled Postharvest Abiotic Stresses as a Tool for Enhancing the Nutraceutical Content and Adding-Value of Fresh Fruits and Vegetables*. *Journal of Food Science*. 5.Vol. 68, pp. 1560-1565.
- Couture, R., Cantwell, M.I., Ke, D., Saltveit, M.E. (1993). *Physiological attributes and storage life of minimally processed lettuce*. *HortScience* 28, pp. 723–725.
- Dafne (sd). *Produtos de Colorimetria - fundamentos*. In: Alegria, C.S.M. (2007). *Processos de descontaminação alternativos em cenoura minimamente processada: natureza dos tratamentos e local de aplicação*. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciências e Engenharia dos Alimentos. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. pp. 119.
- Damodaran, S., Parkin, K., Fennema, O. R. (2008). *Fennema's food chemistry*. 4. ed. Boca Raton: CRC Press. pp. 1144.
- Del Valle, J. M., Aguilera, J. M. (1999). *Review: high pressure CO₂ extraction. Fundamentals and applications in the food industry*. *Food Science and Technology International*, London, v. 5, pp. 1-24.
- Díaz-Reinoso, B. (2007). *Antioxidant Extraction by Supercritical Fluids, in Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*. CRC Press. pp. 275-303.
- Dimitrios, B. (2006). *Sources of natural phenolic antioxidants*. *Trends in Food Science and Technology*, v. 17, n. 9, pp. 505-512.
- EN ISO 4833:2003 - *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Colony-count technique at 30 °C*.
- Erdman, J. (2005). *Flavonoids and Heart Health*. *Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop*, Washington, DC. *The Journal of Nutrition*, 2007. 137(3), pp. 718-737.
- Erkan, M., Wang, S. Y., Wang, C. Y. (2008). *Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme and decay in strawberries fruit*. *Postharvest Biology and Technology*, v.48, n.2, pp. 163-171.

Gębczyński, P. (2006). *Content of selected antioxidative compounds in raw carrot and in frozen product prepared for consumption*. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, 9(3). Disponível em: <http://www.ejpau.media.pl/volume9/issue3/art-03.html>

Gershenzon J. (1998). *Plant defenses: surface protection and secondary metabolites*. In: Taiz L, Zeiger E, editors. *Plant physiology*. Sunderland, Mass.: TheSinauer Associates, Inc. pp. 347–76.

Gonçalves, M.S. (2005). *Gestão de Resíduos Orgânicos*. SPI – Sociedade Portuguesa de Inovação, Porto, pp. 104.

Grajek, W., Olejnik A., and Sip A. (2005). *Probiotics, Prebiotics and Antioxidants as Functional Foods*. Acta Biochimica Polonica.

Harborne, J. B.; Williams, C. A. (2000). *Advances in flavonoid research since 1992*. Phytochemistry, New York, v. 52, n. 6, pp. 481- 504.

Heo, H.J., Kim, Y.J., Chung, D., Kim, D.O. (2007). *Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system*. Food Chemistry. 104, pp. 87–92.

Heredia, J.B., Cisneros-Zevallos, L. (2009). *The effect of exogenous ethylene and methyl jasmonate on pal activity, phenolic profiles and antioxidant capacity of carrots (Daucus carota) under different wounding intensities*. Postharvest Biology and Technology. 51, pp. 242–249.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibanez, E. (2006). *Sub and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-byproducts, algae and microalgae: a review*. Food Chemistry, London, v. 98, n. 1, pp. 136-148.

Hopkins, W. G., Huner, N. P. A. (2004). *Introduction to Plant Physiology*. 3ª ed. United States of America, pp. 493-513.

INE, I.P. (2012). *Estatísticas Agrícolas 2012*. Lisboa – Portugal.

ISO 8587:1988 – *Sensory Analysis – Methodology – Ranking*.

Jacobo-Velázquez, D.A., Cisneros-Zevallos, L. (2012). *Na Alternative Use of Horticultural Crops: Stressed Plants as Biofactories of Bioactive Phenolic Compounds*. Journal of Agriculture, pp. 260 – 271.

Jacobo-Velázquez, D.A., Martínez-Hernández, G.B., Rodríguez, S., Cao, C.-M., Cisneros-Zevallos, L. (2011). *Plants as biofactories: Physiological role of reactive oxygen species on*

the accumulation of phenolic antioxidants in carrot tissue under wounding and hyperoxia stress. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59, pp. 6583–6593.

Kahkonen, M. P., Hopia, I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. (1999). *Antioxidante activity of plants extracts containing phenolic compounds.* Journal of Agriculture and Food Chemistry, 47(10), pp. 3954-62.

Kakiomenou, K., Tassou, C. Nychas, G.J. (1996). *Microbiological, physicochemical and organoleptic changes of shredded carrots stored under modified storage.* International Journal of Food Science and Technology, 31 (4): 359-366.

Kurz, C., Carle, R., Schieber, A. (2008). *HPLC-DAD-MSn characterisation of carotenoids from apricots and pumpkins for the evaluation of fruit product authenticity.* Food Chemistry, London, v. 110, pp. 522-530.

Lafuente T., Lopez-Galvez G., Cantwell M., Fa Yang S. (1996). *Factors influencing etylene-induced isocoumarin formation and increased respiration in carrots.* Journal of the American Society for Horticultural Science. 121(3): 537–42

Larrauri, J.A., Rupérez, P., Saura-Calixto, F. (1997). *Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels.* Journal Agriculture and Food Chemistry, v. 45, pp. 1390-1393.

Marinova, D., Ribarova, F. (2007). *HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries.* Journal of Food Composition and Analysis, Davis, v. 20, n. 5, pp. 370-374.

Mercier, J.J., Arul, J., Julien, C. (1994). *Effect of food preparation on the isocoumarin 6-methoxymellein content of UV-treated carrots.* Food Research International, 27:401–404.

Montgomery, D.C. (1997). *Design and analysis of experiments.* John Wiley & Son, New York.

Moraes, F., Luciane, M., Colla, L. (2006). *Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde.* Revista Eletrônica de Farmácia, v. 3, n. 2, pp. 109-122.

Moretti, C. L. (2007). *Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças.* Brasília: Embrapa Hortaliças e SEBRAE, pp. 531

Moretti, C.L. (2006). *Aproveitamento de resíduos do processamento mínimo de frutas e hortaliças.* Embrapa. São Paulo.

Moritz, B., Tramonte, V. (2006). *Biodisponibilidade do licopeno.* Revista de Nutrição, v. 19, n. 2, pp. 265-273.

Novak, I., Seruga, M., Oliveira-Brett, AM. (2008) *Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grapes skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. Analytica Chimica Acta, 630.

NP 2966 (1993) - Norma portuguesa: *Derivados de cereais: Pão. Determinação dos teores de água e de matéria seca*. 2ª ed., Instituto Português de Qualidade, 1995.

Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. (2002). *Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3122-3128.

Pacheco, T.F. (2011). *Produção de etanol: primeira ou segunda geração?* Circular Técnica. Brasil. 4:6.

Patel, J. (2008). *A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids*. Lethbridge Undergraduate Research Journal. 3(2).

Petitjean-Freytet, C., Carnat, A., Lamaison, J.L. (1991). *Teneurs en flavonoids et en derives hydroxycinnamiques de la fleurs de Sambacus nigra L*. Journal de Pharmacie de Belgique. 46, pp. 241-246.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001). *Antioxidantes de los alimentos: aplicaciones prácticas*. Acribia, S. A. España, pp. 364.

Raghuveer, C., Tandon, R. V. (2009). *Consumption of functional food and our health concerns*. Pakistan Journal of Physiology. 5(1).

Raventós, M., Duarte, S., Alarcón, R. (2002). *Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview*. Food Science and Technology International, London, v. 8, n. 5, pp. 269-284.

Reay, P., Lancaster, J. (2001). *Accumulation of anthocyanins and quercetin glycosides in 'Gala' and 'Royal Gala' apple fruit skin with UV-B-visible irradiation: modifying effects of fruit maturity, fruit side, and temperature*. Scientia Horticulturae, 90:57-68.

Reyes, L.F., Villarreal, J.E., Cisneros-Zevallos, L. (2007). *The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit and vegetable tissue*. Food Chemistry. 101, pp. 1254-1262.

Ribereau-Gayon, P. (1968). *Propriétés chimiques des phenols. Applications aux produits naturels*. In *Les composés phenoliques des végétaux*. Paris: Dunod.

- Rolle, R. S. (2010). *Processing of fresh-cut tropical fruits and vegetables: a technical guide*. Bangkok: FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. pp. 86.
- Roya, B., Freitas, E., Barros, E. (2011). *Biogás- uma energia limpa*. Revista electrónica Novo Enfoque. v. 13, n. 13, pp. 142 – 149.
- Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G. (2006). *Metodologia científica: Determinação da actividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP)*. Comunicado Técnico. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
- Saltveit, M.E. (2000). *Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock*. Postharvest Biology and Technology, 21: 61–69
- Santocono, M., Zurria, M., Berrettini, M., Fedeli, D., Falcioni, G. (2007). *Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 88, n. 1, pp. 1-10.
- Schieber, A., Shintzing, F.C. e Carle, R. (2001). *Byproducts of plants food processing as a source of functional compounds – recent developments*. Trends in Food Science & Technology. 12(11):401-413.
- Scolastici, C., Lima, R. O., Barbisan, L. F., Ferreira, A. L., Ribeiro, D. A., Salvadori, D. M. (2007). *Lycopene activity against chemically induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells*. Toxicology in Vitro, v. 21, pp. 840-845.
- Secretaria de Recursos Hídricos e Energético. (2014). Disponível em: http://www.srhe.pe.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=279&Itemid=98 . Acesso em 3.6.2014
- Shahidi, F., Ho, C. (2007). *Antioxidant Measurement and Applications*. American Chemical Society. pp. 956.
- Shewfelt, R.L. (1987). *Quality of minimally processed fruits and vegetables*. Journal of Food Quality. 10, pp. 143–156.
- Silva, C., Naves, M. (2001). *Suplementação de vitaminas na prevenção de câncer*. Revista de Nutrição, v. 14, n. 2, pp. 135-143.
- Silva, E. (2013). *Composição bioactiva de cenoura em função da época de colheita e do processamento mínimo*. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa. Pp.65

Silva, R.C.O., Nascimento, J.D.M., Curvêlo, A.C., Araújo, C.R., Lima, V.L.A.G., Maciel, M.I.S., Silva, C.G.M., Melo, E.A. (2010). *Atividade antioxidante de extractos das cascas desidratadas de frutos de cajá umbuzeiros*. Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, JEPEX – UFRPE, Recife.

Simon, P. W., & Wolff, X. Y. (1987). *Carotene in typical and dark orange carrots*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35, pp. 1017-1022.

Soares, S. E. (2002). *Ácidos fenólicos como antioxidantes*. Revista de Nutrição, v. 15, n. 1, pp. 71-81.

Strathmann, H. (1990). *Synthetic membranes and their preparation*. In: PORTER, M.C. *Handbook of industrial membrane technology*. New Jersey: Noyes Publications.

Street, D. A., Comstock, G. W., Salkeld, R. M., Schuep, W., Klag, M. J. (1994). *Serum antioxidants and myocardial infarction*. Circulation, Dallas, v. 90, pp. 1154-116

Swain, T., Hillis, W. E. (1959). *The phenolic constituents of Prunus domestica. The quantitative analysis of phenolic constituents*. Journal of the Science of Food and Agriculture. 10: 63-68.

Taiz, L., Zeiger, E. (2009). *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 4.ed. pp. 819.

Talcott, S.T., Howard, L.R. (1999). *Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, pp. 2109-2115.

Thom, E. (2007). *The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people*. Journal of International Medical Research. 35, pp. 900–908.

United States Department of Agriculture, Economic Research Service. (2003). *Vegetables and Specialties Situation and Outlook Yearbook*.

VALUE (2012) - *Guia para a Seleção das Melhores Técnicas Disponíveis de Valorização na Região do SUDOE. Intercâmbio e Transferência Tecnológica sobre a Valorização de Resíduos da Indústria de Transformados Vegetais do SUDOE*.

Vekiari, S. A., Oreopoulou, V., Tzia, C., Thomopoulos, C. D. (1993). *Oregano flavonoids as lipid antioxidants*. Journal of the American Oil Chemists Society, Chicago, v. 70, n. 5, pp. 483-487.

Vinson, J.A., Su, X., Zubik, L., Bose, P. (2001). *Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49, pp. 5315–5321.

Watada, A. E., Abe, K., Yamauchi, N. (1990). *Physiological activities of partially processed fruits and vegetables*. Food Technology, Champaign, v. 44, n. 5, pp. 116-122.

Zancan, K. C., Marques, M. O. M., Petenate, A. J., Meireles, M. A. A. (2002). *Extraction of ginger (Zingiber officinale Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts*. The Journal of Supercritical Fluids, New York, v. 24, n. 1, pp. 57-76.

Zhang, D., Hamauzu, Y. (2004). *Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (Daucus carota L.)*. Journal of Food, Agriculture and Environment, 2(1), 95-100.

Anexos

Tabela 11 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0, 1 e 3 dias) nos valores médios de pH e TSS (\pm DP) de amostras de subprodutos de cenoura.

Operação corte	Temperatura armazenamento	Tempo armazenamento	pH	TSS
SC	5 °C	0	$5,8^{ab} \pm 0,1$	$3,7^{ce} \pm 0,2$
	TA		$5,9^b \pm 0,3$	$5,0^c \pm 1,0$
CC	5 °C		$5,9^{ab} \pm 0,1$	$4,7^c \pm 0,1$
	TA		$5,8^{ab} \pm 0,0$	$4,6^c \pm 0,0$
SC	5 °C	1 dia	$5,6^{ab} \pm 0,2$	$3,0^{abd} \pm 0,1$
	TA		$5,6^{ab} \pm 0,1$	$3,3^{abde} \pm 0,4$
CC	5 °C		$5,3^{ac} \pm 0,0$	$4,1^{cde} \pm 0,2$
	TA		$4,9^{cd} \pm 0,1$	$2,6^{ab} \pm 0,3$
SC	5 °C	3 dias	$5,7^{ab} \pm 0,2$	$3,5^{bcde} \pm 1,2$
	TA		$5,4^{abc} \pm 0,5$	$2,8^{ab} \pm 0,5$
CC	5 °C		$4,7^d \pm 0,0$	$3,3^{abd} \pm 0,4$
	TA		$5,4^{abc} \pm 0,3$	$2,1^a \pm 0,2$

Numa coluna, letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (teste Tukey HSD).

Tabela 12 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0, 1 e 3 dias) nos valores médios de teor fenólico total (\pm DP) de amostras de subprodutos de cenoura.

Operação corte	Temperatura armazenamento	Tempo armazenamento	CFT (mg EAC.100g ⁻¹)
SC	5 °C	0	42,9 ^{ab} \pm 3,5
	TA		48,0 ^{abc} \pm 4,5
CC	5 °C		48,1 ^{abc} \pm 3,8
	TA		50,6 ^{abc} \pm 7,8
SC	5 °C	1 dia	34,8 ^a \pm 20,4
	TA		51,0 ^{abc} \pm 18,2
CC	5 °C		53,7 ^{abc} \pm 3,3
	TA		75,0 ^{cd} \pm 11,8
SC	5 °C	3 dias	32,5 ^a \pm 3,5
	TA		69,6 ^{bcd} \pm 14,4
CC	5 °C		87,2 ^d \pm 9,7
	TA		55,1 ^{abc} \pm 9,1

Numa coluna, letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (teste Tukey HSD).

Tabela 13 - Efeitos do corte (sem corte – SC e com corte - CC), temperatura (5 °C e temperatura ambiente - TA) e tempo de armazenamento (0 e 3 dias) nas contagens médias de Microrganismos a 30 °C (\pm DP) de amostras de subprodutos de cenoura.

Operação corte	Temperatura de armazenamento	Tempo armazenamento	Micro. 30 °C (Log ₁₀ ufc.g ⁻¹)
Subprodutos*		0	7,9 ^a \pm 0,1
SC	5 °C	3 dias	8,6 ^b \pm 0,0
	TA		8,8 ^b \pm 0,1
CC	5 °C		9,2 ^c \pm 0,0
	TA		9,8 ^d \pm 0,0

*Subprodutos – Contaminação inicial; Numa coluna, letras diferentes representam diferenças significativas a $p=0,05$ (teste Tukey HSD).